

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Biología Molecular y Celular

**Análisis estructural y funcional
de la polimerasa
del virus de la gripe**

TESIS DOCTORAL

PATRICIA RESA INFANTE
Junio, 2010

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Biología Molecular y Celular

Análisis estructural y funcional de la polimerasa del virus de la gripe

Memoria presentada por Patricia Resa Infante
para optar al título de Doctor

Madrid, Junio 2010

El trabajo presentado en esta Memoria ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular y Celular del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), bajo la dirección del Dr. Juan Ortín Montón.

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al disfrute de una beca predoctoral I3P del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

*“Se buscan hombres para un viaje peligroso.
Sueldo bajo. Frío extremo.
Largos meses de completa oscuridad. Peligro constante.
No se asegura retorno con vida.
Honor y reconocimiento en caso de éxito.”*

Texto del anuncio que Shackleton publicó en la prensa británica para reclutar a su tripulación



Fotografía: Frank Hurley © Royal Geographical Society

PARA MI MADRE

Agradecimientos

La vida es cuestión de prioridades

Ahora llega uno de esos momentos de “párate y piensa”, en que te planteas el futuro haciendo recuento de lo pasado. Y por ello quiero dar las gracias a muchas personas.

Siempre se dice que al trabajo no se va a hacer amigos, pero puedo certificar que he encontrado grandes amistades durante esta etapa. Gracias, porque sin vosotros me sentiría perdida.

Muchas gracias a...

A Juan, por ser un jefe envidiable, por enseñarme, tener siempre la puerta abierta, aconsejarme en los momentos de angustia y por creer en mí. Porque sabes sacar lo máximo exigiendo sólo un poquito más.

A Noelia, porque contigo el trabajo en equipo adquiere una nueva dimensión. Mil gracias por saber pararme los pies a tiempo y porque esta Tesis no hubiese sido posible sin ti.

A Yolanda, por toda tu ayuda y esas opiniones basadas en la experiencia.

A Maite, porque compartir la poyata contigo ha sido un verdadero placer, igual que los diversos momentos *all around the world*.

A Susana, por todo. Por compartir tu tiempo y tus amistades (Pilar, Clara, Ana, Raquel...). Porque es importante “sentar la cabeza y pensar...”. *I thank you for critically reading this manuscript*.

A Rocío, por escucharme y entenderme. Porque colaborar con alguien nunca fue más sencillo.

A Núria, por el diálogo, por ese paper que tenemos juntas y por aquellas cañas de verano.

A Sara y Joan, porque las pintas de St.Patrick saben mejor con vosotros.

A Lorena, Marcela, Ana y Pepe, porque aún no hemos compartido mucho tiempo, pero promete.

A Urtzi porque tenías razón, Madrid cambia a las personas.

A Amelia, por tu cercanía y por aportar otra visión.

A Emilio, por tu amistad, tus consejos, las conversaciones científicas o de la vida en general y por todas las risas.

A Alicia, por esas risas de “horror” y ayudarme en tantas ocasiones.

Al resto de compañeros del 118, Ariel, Roberto, Tom, Paloma, Pablo y Catalina.

A todos los del CNB que me han ayudado ofreciéndome sus conocimientos o su compañía: Ana, Nerea, Idoia, Aitor, Socorro, Sylvia y un largo etc.

A Eva, por tu paciencia y tus ganas de enseñar.

A Óscar, mi jefe en el CIB, por sacar tiempo para mí entre los millones de *post-it's*.

A Mari Ángeles, por facilitarme las cosas y por las cañas que nos quedan por tomar.

A Carmen, porque poco a poco las cosas salen mejor.

A Jaime, por aclarar mis dudas estructurales y liarme más la cabeza.

A Juana, por iniciarme en la investigación y seguir interesándote en mis pasos.

A Antonio, por la ciencia y mil consejos. Por hablarme de un laboratorio muy bueno en Madrid y convencerme de que es una ciudad que merece ser vivida.

A todos con los que compartí poyata durante esa primera etapa de investigación: Nicoletta (*I thank you so much the time that you invested in me and all the beers after working*), Leo, Damià, Isabel y Rui.

All the people I met during my short stay in Harvard. Specially Sean (for being a boss and a teacher), Amal (for all your time), Phil (for all your suggestions and discussions) and Amy (because we have many beers to share yet). I can't forget Maite, Dave, Tamir, Asun and Ana. Thank you all for your friendship and help.

A mis compañeras de piso, Daniela, Carmen y especialmente Mar, por hacer del piso un hogar.

A Patxi, porque aún podemos cambiar el mundo.

A Jaume, gracias por poder contar contigo *anytime* y hacer fácil que crezca la amistad a pesar de la distancia.

A Jesús, por seguarnos los pasos de cerca.

A Manolo, por esas cervezas que enturbian las noches.

A Esther, por tu amistad incondicional.

A mis nenes, Gemma, Alba y Meri, porque vuestra amistad es uno de los pilares fundamentales en mi vida.

Al Dani y al Herra, por vuestro cariño, por los viajes y experiencias compartidos, y los que nos quedan por vivir.

A los amigos del pueblo, en especial a Sonia por estar pendiente de mí.

A mis abuelos, por creer en mí y estar tan orgullosos de su nieta.

A Iván, por los viajes compartidos y por tu amistad.

A Rubén, por enseñarme mil cosas de la vida y demostrarme que el tiempo nos pone a todos en nuestro lugar.

A mi hermana, por hacer ver que entiende todas las historietas científicas que le cuento. Flaviona soy quien soy en gran parte por "tu culpa".

A mi padre. Gracias por eso, por ser mi padre. Por quererme y apoyarme en todas las decisiones.

A mi madre por la vida. Por seguirme allí donde vaya, por escucharme y estar por mis huesines todos los días. Porque te conozco como si te hubiera parido y eres mi ejemplo.

Gracias a todos los que se han cruzado en el camino de mi vida porque han colaborado a ser lo que soy.

Aunque, sigo *under construction*, así que intentaré mejorar.



ÍNDICE

Perhaps a lunatic is simply
a minority of one.

George Orwell

Índice general

Índice de figuras y tablas	19
Summary	25
Resumen	27
Introducción	
1. El virus de la gripe	32
1.1. Historia	32
1.2. Clasificación y nomenclatura	33
1.3. La partícula viral.....	33
1.3.1. Proteínas virales.....	33
1.3.2. Genoma viral.....	35
1.3.2.1. El promotor viral	36
1.3.2.2. RNAs virales presentes en la célula infectada	37
2. Ciclo de infección viral	38
2.1. Entrada de las partículas virales.....	38
2.2. Transcripción, replicación y expresión génica	38
2.3. Procesamiento de los RNAs virales y síntesis de proteínas	39
2.4. Formación de nuevas partículas virales.....	40
2.5. Salida de nuevas partículas virales.....	40
3. La polimerasa viral	41
3.1. Proteína Básica 1: PB1	41
3.2. Proteína Ácida: PA.....	42
3.3. Proteína Básica 2: PB2.....	42
3.4. Ensamblaje de la polimerasa viral.....	44
3.5. Estructura y oligomerización de la polimerasa viral	44
4. Proceso de replicación del virus de la gripe.....	45
5. Proceso de transcripción del virus de la gripe	47
5.1. Otros bolsillos de unión a <i>cap</i> descritos: CBC, eIF4E y VP39.....	48

6. Factores celulares asociados a la polimerasa	49
7. Microscopía electrónica y procesamiento digital de imágenes individuales	50
7.1. Introducción al microscopio electrónico	51
7.2. Técnicas de preparación del espécimen.....	51
7.3. Obtención de micrografías	52
7.4. Análisis de las micrografías y generación del modelo del espécimen.....	52
7.5. Cálculo de la resolución.....	55

Objetivos	59
------------------------	-----------

Materiales

1. Líneas celulares eucariotas	63
2. Bacterias.....	63
3. Virus	63
4. Plásmidos	63
5. Anticuerpos	63
6. Resinas de cromatografía.....	64

Métodos

1. Construcción de plásmidos	64
2. Transfección de cultivos celulares	
2.1. Fosfato cálcico.....	65
2.2. Infección con vTF7-3 y transfección con fosfato cálcico	66
2.3. Fugene HD.....	66
3. Reconstitución de RNPs <i>in vivo</i>	66
4. Purificación de polimerasa recombinante	
4.1. Obtención de extractos celulares	66
4.2. Purificación por cromatografía de afinidad a 7mGTP-Sepharose-4B	67
4.3. Purificación por cromatografía de afinidad a Ni ²⁺ -NTA- Agarosa	67
4.4. Purificación por doble cromatografía de afinidad a 7mGTP- Sepharose-4B y Ni ²⁺ -NTA- Agarosa.....	67
4.5. Purificación por cromatografía de exclusión molecular	67
5. Purificación de RNP recombinante	
5.1. Obtención de extractos celulares	67

5.2. Purificación por cromatografía de afinidad a Ni ²⁺ -NTA- Agarosa.....	68
5.3. Purificación por cromatografía de afinidad TAP	68
6. Análisis de proteínas	
6.1. Western Blot	68
6.2. Tinción de geles.....	68
6.3. Electroforesis en gel nativo.....	69
6.4. Determinación de proteína CAT.....	69
6.5. Inmunofluorescencia	69
7. Análisis de RNA	
7.1. Extracción del RNA	69
7.2. Marcaje del RNA.....	69
7.3. Hibridación dot-blot	69
7.4. Transcripción <i>in vitro</i> de polimerasa recombinante.....	70
7.5. Transcripción <i>in vitro</i> de RNPs recombinantes.....	70
8. Microscopía electrónica.....	71

Resultados

1. Análisis estructural y funcional de un complejo mínimo de replicación del virus de la gripe	77
1.1. Purificación de la RNA polimerasa recombinante del virus de la gripe por cromatografía de afinidad a un análogo de <i>cap</i>	77
1.2. Purificación de alto rendimiento de la RNA polimerasa recombinante	78
1.3. Análisis del estado de agregación de la RNA polimerasa purificada	78
1.4. Generación de complejos de RNA polimerasa viral-vRNA.....	78
1.5. Análisis del estado de agregación del complejo RNA polimerasa-vRNA purificado	81
1.6. Análisis estructural de los monómeros del complejo polimerasa-vRNA.....	82
1.6.1. Análisis bidimensional de los monómeros del complejo polimerasa-vRNA	82
1.6.2. Reconstrucción tridimensional de los monómeros del complejo polimerasa-vRNA	85
1.7. Análisis funcional de los complejos polimerasa-vRNA	85
1.7.1. Los complejos diméricos polimerasa-vRNA son sensibles a RNAsa	86
1.7.2. La actividad de la polimerasa es necesaria para la generación de complejos polimerasa-vRNA	86
1.7.3. Síntesis de RNA <i>in vitro</i> por los complejos polimerasa-vRNA	87

1.8. Generación de complejos de RNA polimerasa viral-cRNA.....	88
1.9. Análisis estructural de los complejos diméricos de polimerasa-vRNA	89
2. Análisis de las bases estructurales de la unión a <i>cap</i> de la subunidad PB2	91
2.1. Rastreo de dominios estructurales: ESPRIT	91
2.2. Identificación del dominio de unión a <i>cap</i> de PB2.....	92
2.3. Estructura atómica del dominio de unión a <i>cap</i> de PB2 con el 7mGTP unido.....	93
2.4. Análisis de la unión a <i>cap</i> en mutantes puntuales de PB2	94
2.5. Análisis funcional <i>in vivo</i> de los mutantes en el sitio de unión a <i>cap</i>	95
2.6. Análisis funcional <i>in vitro</i> de los mutantes en el sitio de unión a <i>cap</i>	95
3. Análisis de las señales de localización nuclear de PB2.....	97
3.1. Análisis de la localización intracelular de los mutantes puntuales en la NLS de PB2	97
3.2. Análisis funcional <i>in vivo</i> de las mutaciones en la NLS de PB2	99
3.3. Análisis del efecto de la inserción de una NLS ectópica en el extremo C-terminal de los mutantes de PB2 en la NLS.....	100
3.4. Análisis de la replicación del RNA viral en los mutantes en la NLS de PB2.....	102

Discusión

1. Profundizando en el ciclo viral: Cómo la RNP inicia la transcripción	107
1.1. Características estructurales del dominio de unión a <i>cap</i> de PB2.....	107
1.2. La unión a <i>cap</i> es termosensible.....	108
1.3. Otras regiones del complejo de la polimerasa deben estar implicadas en la regulación de la unión al <i>cap</i>	108
1.4. El <i>loop</i> 424 del dominio de unión a <i>cap</i> de PB2 podría tener un papel relevante en la comunicación alostérica entre las subunidades de la polimerasa.....	109
1.5. Nuevas dianas para el desarrollo de compuestos antigripales.....	109
2. Profundizando en el ciclo viral: La formación del complejo heterotrimérico de la polimerasa y su translocación al núcleo	110
2.1. Las importinas α se asocian <i>in vivo</i> con la subunidad PB2 de la polimerasa de gripe ...	110
2.2. Mutaciones en la NLS de PB2 reducen la importación al núcleo de la subunidad y afectan fuertemente la actividad biológica de la polimerasa.....	110
2.3. La interacción PB2-importina α tiene un papel relevante en la replicación del RNA viral.....	111
2.4. Modelo de formación de complejo de polimerasa.....	112

3. Profundizando en el ciclo viral: Una perspectiva estructural de la replicación del RNA viral.....	113
3.1. La interacción con el RNA viral impide la oligomerización de la RNA polimerasa de gripe	113
3.2. Los complejos polimerasa-vRNA purificados son producto de la replicación <i>in vivo</i>	114
3.3. Estructura de la polimerasa del virus de la gripe.....	116
3.4. Una visión estructural del modelo <i>trans/cis</i> para la replicación/transcripción del RNA de gripe	116

Conclusiones	123
---------------------------	-----

Bibliografía	127
---------------------------	-----

Anexos

1. Abreviaturas	141
2. Tabla oligonucleótidos	143
3. Publicaciones	
The structural basis for <i>cap</i> binding by influenza virus polymerase subunit PB2. Nat Struct Mol Biol (2008)	147
The host-dependent interaction of alpha-importins with influenza PB2 polymerase subunit is required for virus RNA replication. PLoS One (2008)	167
The structure and function of a minimal RNA replication complex supports a <i>trans</i> mechanism for influenza virus replication. Nucleic Acids Res (<i>submitted</i>).....	179

Índice de figuras y tablas

Introducción

Fig. In1. Diagrama de los virus que infectan vertebrados.	31
Tabla In1. Pandemias de gripe más conocidas.	32
Fig. In2. El virus de la gripe.	33
Fig. In3. Representación esquemática de una partícula del virus de la gripe.	34
Fig. In4. Estructura del genoma del virus de la gripe.	36
Fig. In5. Modelos de la estructura secundaria propuestas para el promotor viral.	36
Fig. In6. Diagrama de la síntesis del RNA viral.	37
Fig. In7. Ciclo de infección viral.	39
Fig. In8. Dominios de interacción de las subunidades de la polimerasa viral.	41
Fig. In9. Subunidad PB1 de la polimerasa.	42
Fig. In10. Subunidad PB2 de la polimerasa.	43
Fig. In11. Modelos para el ensamblaje de la polimerasa del virus de la gripe.	43
Fig. In12. Modelos tridimensionales de la polimerasa viral soluble libre de RNA y de la polimerasa presente en la RNP.	44
Fig. In13. Oligomerización de la polimerasa.	45
Fig. In14. Diagrama de los procesos de replicación y transcripción virales.	46
Fig. In15. Modelo detallado del proceso de <i>cap-snatching</i> durante la transcripción del RNA viral.	47
Fig. In16. Bolsillos de unión a <i>cap</i> descritos.	48
Fig. In17. Técnicas de preparación de muestras para su análisis mediante ME y procesamiento digital de imágenes individuales.	50
Fig. In18. Esquema del procesamiento de imágenes.	53
Fig. In19. Esquema general del proceso de refinamiento angular.	54

Materiales y métodos

Tabla MM1. Anticuerpos utilizados.	63
--	----

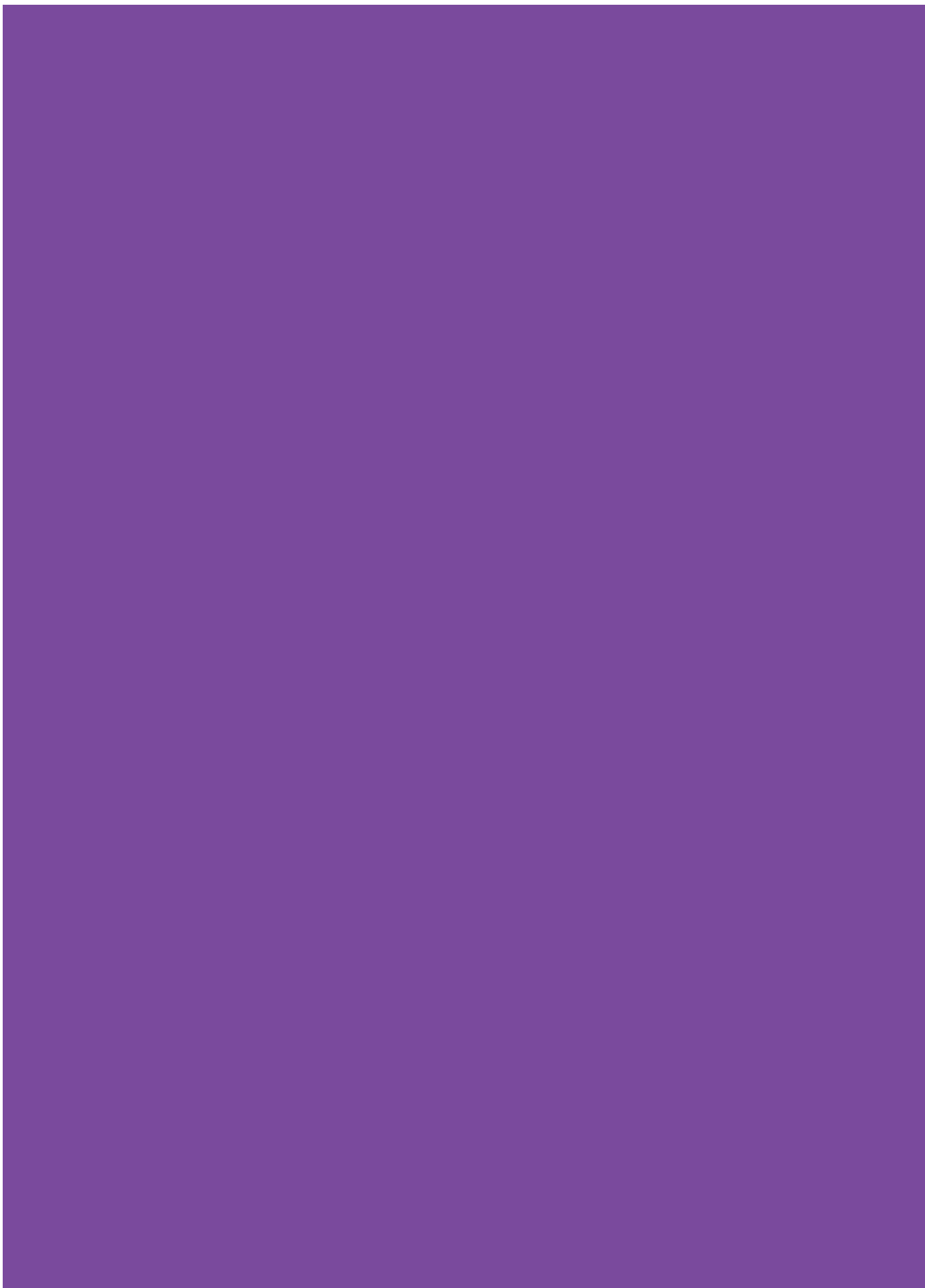
Resultados

Fig. R1. Esquema del proceso de purificación de la polimerasa recombinante por doble cromatografía de afinidad.	77
Fig. R2. Cromatografía en la resina 7mGTP-Sepharose-4B.	78
Fig. R3. Purificación del heterotrímero de polimerasa.	79
Fig. R4. Purificación de los complejos de polimerasa-vRNA.	80
Fig. R5. Análisis del RNA viral asociado a los complejos de polimerasa-vRNA purificados.	80
Fig. R6. Análisis del estado de agregación de los complejos polimerasa-vRNA.	81
Fig. R7. Análisis estructural de los monómeros del complejo polimerasa-vRNA.	82
Fig. R8. Análisis bidimensional de los monómeros del complejo polimerasa-vRNA.	83
Fig. R9. Reconstrucción tridimensional de los monómeros del complejo polimerasa-vRNA.	84
Fig. R10. Comparación entre el complejo polimerasa-vRNA y la polimerasa presente en la RNP.	84
Fig. R11. Los complejos diméricos polimerasa-vRNA son sensibles a RNAsa.	86
Fig. R12. Requerimiento de la actividad polimerasa para la generación de complejos polimerasa-vRNA monoméricos y diméricos.	86
Fig. R13. Síntesis de RNA <i>in vitro</i> por los complejos polimerasa-vRNA.	87
Fig. R14. Purificación y caracterización de complejos polimerasa-cRNA.	88
Fig. R15. Caracterización del RNA asociado a los complejos polimerasa-cRNA.	89
Fig. R16. Análisis bidimensional de las imágenes de las estructuras diméricas de la polimerasa.	90
Fig. R17. Rastreo de dominios estructurales: ESPRIT.	92
Fig. R18. Estructura del sitio de unión a <i>cap</i> de PB2 con 7mGTP unido.	93
Fig. R19. Interacciones del análogo de <i>cap</i> 7mGTP con el bolsillo de unión a <i>cap</i> de PB2.	94
Fig. R20. Diagrama de los mutantes puntuales generados en el sitio de unión a <i>cap</i> de la subunidad PB2.	94
Fig. R21. Actividad de unión a <i>cap</i> de los complejos de polimerasa recombinante silvestres (wt) o mutantes.	94
Fig. R22. Análisis funcional <i>in vivo</i> de mini-RNPs recombinantes silvestres o mutantes.	95
Fig. R23. Análisis funcional <i>in vitro</i> de mini-RNPs recombinantes silvestres o mutantes.	96
Fig. R24. Análisis de la expresión de los mutantes de PB2 en la NLS.	97
Fig. R25. Localización intracelular de los mutantes de PB2 en la NLS.	98
Fig. R26. Actividad biológica de RNPs recombinantes con las proteínas PB2 mutantes.	98
Fig. R27. Formación de complejo de polimerasa con PB2 silvestre o mutante en la NLS.	99

Fig. R28. Localización intracelular de las proteínas PB2 mutantes con una NLS ectópica.	100
Fig. R29. Localización intracelular de las proteína PB2 silvestre o mutante en células co-expresando las otras subunidades de la polimerasa.	101
Fig. R30. Actividad biológica de RNPs recombinantes con una NLS ectópica en la proteína PB2.	101
Fig. R31. Capacidad replicativa de RNPs recombinantes con una NLS ectópica en la proteína PB2.	102

Discusión

Tabla D1. Resumen de la actividad bioquímica y biológica de los mutantes de unión a <i>cap</i> de PB2.	107
Fig. D1. Modelo de la formación del complejo de la RNA polimerasa del virus de la gripe y su importación nuclear.	113
Fig. D2. Diagrama de las regiones de la polimerasa con estructura atómica conocida.	115
Fig. D3. Modelo hipotético para la replicación de los complejos polimerasa-vRNA.	117



SUMMARY

RESUMEN

Summary

Replication and transcription of influenza A virus is carried out by ribonucleoprotein complexes (RNPs) in the nucleus of infected cells. These RNPs are composed of a genomic RNA segment associated to the nucleoprotein and the polymerase complex (formed by the PB1, PB2 and PA subunits). To start the RNA transcription, the PB2 subunit in the polymerase binds the 5' cap of host pre-mRNAs, which are then cleaved 10–13 nucleotides downstream by the PA subunit.

In this Doctoral Thesis, we have expressed, purified and analysed structurally and functionally for the first time, polymerase-RNA template complexes obtained after *in vivo* replication. These complexes were generated by co-transfection of plasmids expressing the three-polymerase subunits and a genomic plasmid expressing a minimal template of either positive- or negative-polarity. Their generation *in vivo* was strictly dependent on the polymerase activity, they contained mainly negative-polarity viral RNA and were able to transcribe and replicate *in vitro*. *In vivo* replication intermediates appeared as either monomers or dimers of the polymerase, most of the latter being sensitive to RNase treatment. The 3D structure of the monomeric polymerase-vRNA complexes was similar to the RNP-associated polymerase. Structural analyses of the dimeric complexes indicated the presence of tight dimers compatible with a defined interaction between two monomers. These results provide structural support for the *trans/cis* model for influenza RNA replication and transcription.

On the other hand, we have identified an independently folded domain of PB2 that possesses specific cap binding activity. The X-ray structure of the domain with bound cap analog reveals a mode of ligand binding that is similar to, but distinct from, other cap binding proteins. Binding and functional studies with point mutants confirmed that the identified site is essential for cap binding *in vitro* and cap-dependent transcription *in vivo* by the trimeric polymerase complex.

Finally, we have studied the relevance of the interaction between PB2 and α -importins for virus replication. The PB2 NLS was mutated and the phenotype of mutant subunits, polymerase complexes and RNPs was analysed. While mutant PB2 proteins showed reduced nuclear accumulation, they formed polymerase complexes normally. However, mutant RNPs generated with a viral CAT replicon showed up to hundred-fold reduced CAT accumulation. Rescue of nuclear localisation of mutant PB2 by insertion of an additional SV40 TAG-derived NLS did not revert the mutant phenotype of RNPs. Furthermore, determination of recombinant RNP accumulation *in vivo* indicated that PB2 NLS mutations drastically reduced virus RNA replication. These results indicate that, above and beyond its role in nuclear accumulation, PB2 interaction with α -importins is required for virus RNA replication.

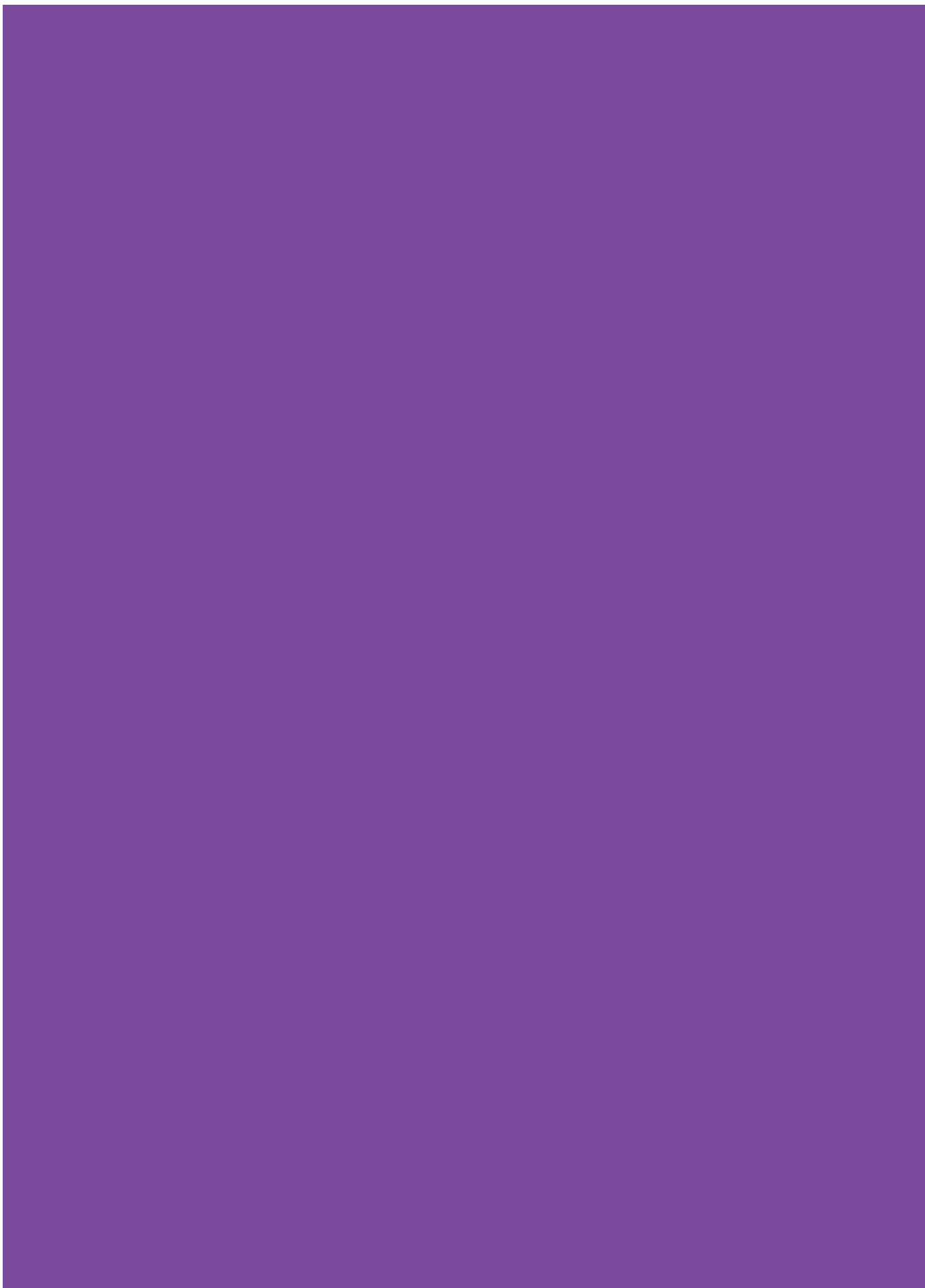
Resumen

La replicación y la transcripción del virus de la gripe se llevan a cabo por ribonucleoproteínas virales (RNPs) en el núcleo de las células infectadas. Estas RNPs se componen de un segmento de RNA genómico asociado a nucleoproteína y a la polimerasa (formada por las subunidades PB1, PB2 y PA). Para iniciar la transcripción, la polimerasa se une a los pre-mRNAs del hospedador por la interacción de la estructura *cap* con la subunidad PB2 y los corta a unos 10-13 nucleótidos del *cap* mediante la actividad endonucleasa de la subunidad PA.

En esta Tesis, se han expresado, purificado y analizado estructural y funcionalmente complejos polimerasa-RNA molde que son producto de la replicación *in vivo*. Estos complejos se generaron por co-transfección de plásmidos de expresión de las subunidades de la polimerasa y de un molde mínimo de polaridad positiva o negativa. Su generación *in vivo* es estrictamente dependiente de la actividad de la polimerasa, contienen principalmente RNA viral de polaridad negativa y son capaces de transcribir y replicar *in vitro*. Los intermediarios replicativos *in vivo* resultaron ser monómeros o dímeros de la polimerasa, siendo la mayoría de estos últimos sensibles al tratamiento con RNasa. La estructura 3D de los complejos monoméricos fue similar a la de la polimerasa asociada a la RNP. El análisis estructural de los complejos diméricos indicó la presencia de dímeros estrictos, compatibles con una interacción definida de dos monómeros. Estos resultados dan soporte al modelo *trans/cis* de la replicación y transcripción del RNA de gripe.

Por otro lado, se identificó un dominio independiente de PB2 con capacidad específica de unión a *cap*. La estructura atómica de este dominio con un análogo de *cap* unido reveló una unión al ligando similar aunque diferente a otras proteínas de unión a *cap*. Estudios funcionales y de unión a *cap* con mutantes puntuales confirmaron que el bolsillo identificado es esencial para la unión a *cap in vitro* y para la transcripción dependiente de *cap in vivo*.

Finalmente, se estudió la relevancia de la interacción entre PB2 y las importinas α para la replicación viral. Se mutó la NLS de PB2 y se analizó el fenotipo de la subunidad, los complejos de la polimerasa y las RNPs mutantes. Mientras que las proteínas PB2 mutantes mostraron una acumulación nuclear reducida, la formación de complejo de polimerasa fue normal. Sin embargo, las RNPs mutantes generadas con un replicón CAT viral mostraron una reducción en la acumulación de CAT de cien veces. El rescate de la localización nuclear mediante la inserción de una NLS adicional derivada del Tag de SV40 no revertió el fenotipo mutante de las RNPs. Además, la acumulación de RNPs recombinantes *in vivo* indicó que las mutaciones en la NLS de PB2 reducían drásticamente la replicación del RNA viral. Estos resultados indican que la interacción de PB2 con importina α se requiere para la replicación del RNA viral además de para el transporte de dicha subunidad al núcleo.



INTRODUCCIÓN

Quoting one is plagiarism.
Quoting many is research.

William Mizner

Los virus son las partículas autoreplicativas más pequeñas, históricamente caracterizadas por su capacidad para pasar a través de filtros que retenían incluso la más pequeña bacteria. Los virus no tienen un metabolismo propio y por ello están obligados a invadir células y parasitar la maquinaria celular, subvirtiéndola en su propio beneficio (Condit, 2007). Por tanto, la célula hospedadora no sólo permite la síntesis viral,

sino que participa activamente en los procesos de multiplicación viral. Como consecuencia de la infección, en muchos casos se produce un trastorno en la viabilidad celular.

Los virus se clasifican en función de la morfología del virión (**Fig. In1**). Dentro de los virus que contienen RNA como material genético, los virus de polaridad negativa se caracterizan porque su genoma de cadena sencilla debe ser transcrito a su cadena complementaria para obtener el RNA mensajero que será traducido

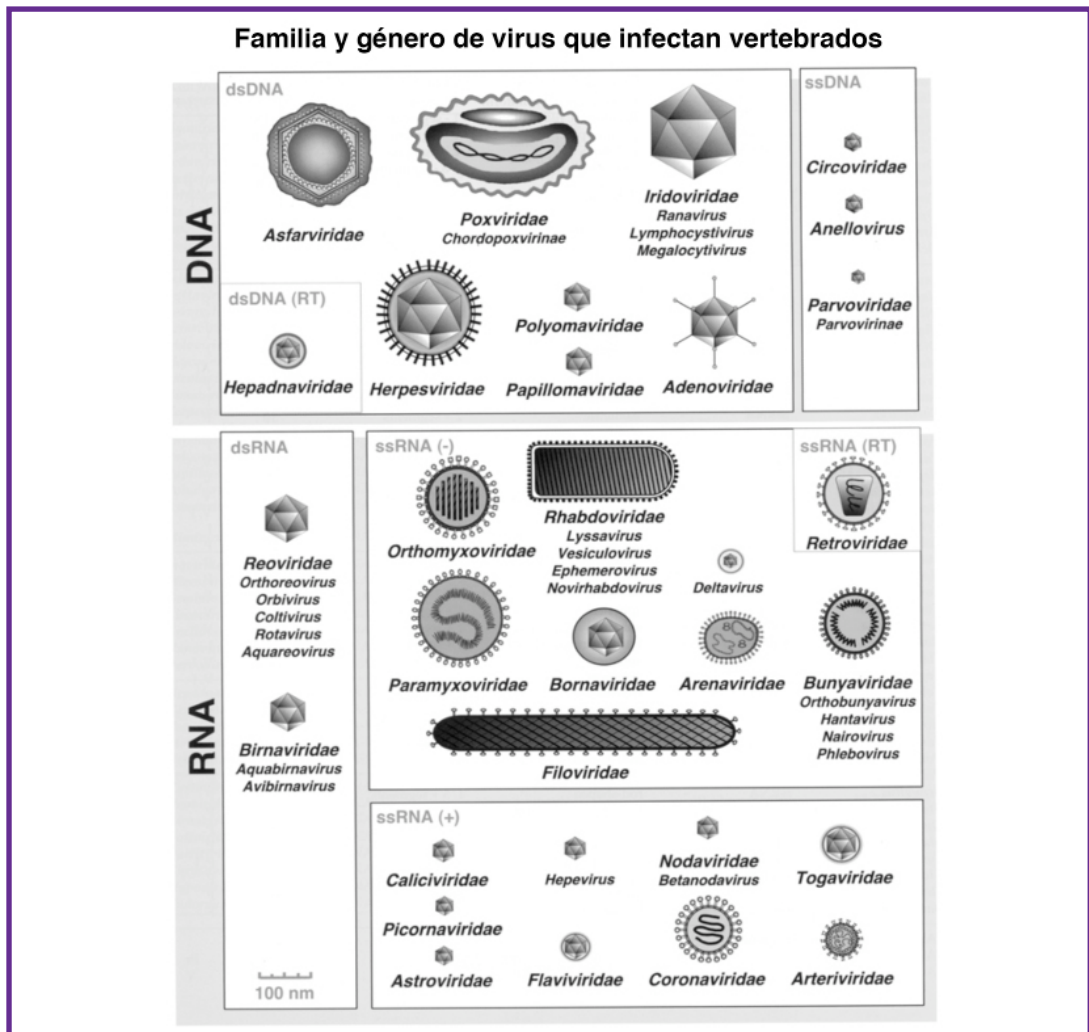


Figura In1. Diagrama de los virus que infectan vertebrados. Los diagramas han sido dibujados a una escala relativa y agrupados según el tipo de genoma y la estrategia de replicación. ds = hebra doble, ss = hebra sencilla, (-) = RNA de polaridad negativa, (+) = RNA de polaridad positiva (Adaptado de Condit, 2007).

a proteínas. Esta transcripción es efectuada por una transcriptasa viral (RNA polimerasa RNA dependiente) que está presente en el virión.

1. El virus de la gripe

1.1. Historia

La gripe es una patología respiratoria altamente contagiosa que ha afectado a la humanidad desde tiempos inmemoriales. Durante el Renacimiento, el hecho de que la enfermedad afectara de forma indiscriminada a distintos estamentos sociales sugestionó a la población e hizo que este mal transitorio se atribuyera a la *influencia* de una determinada conjunción de los astros. Este es el origen del nombre influenza para denominar la enfermedad en varios idiomas (Stuart-Harris et al, 1985). El agente causante de la gripe es un virus aislado por primera vez de humanos en 1933 (Smith et al, 1933).

El virus de la gripe es un agente patógeno altamente variable que ocasiona epidemias anuales y pandemias ocasionales. Estas propiedades han permitido definir la gripe como una enfermedad constante causada por un virus cambiante (Kilbourne, 1980).

Estos virus suelen estar en equilibrio evolutivo en otras especies, aves silvestres principalmente, en las que replican eficazmente pero a las que no causan enfermedad. Sin embargo, ocasionalmente se transmiten a la población humana dando lugar a pandemias de gran impacto, como la de 1918, conocida como “gripe española”, que causó entre 20 y 40 millones de muertos en todo el mundo (**Tabla In1**) (Gibbs et al, 2001a; Gibbs et al, 2001b; Kawaoka et al, 1989; Kilbourne, 2006).

La gran variabilidad viral está asociada a

Nombre de la pandemia	Fecha	Muertes	Subtipo
Gripe española	1918–1919	20- 40 millones	H1N1
Gripe asiática	1957–1958	1 a 1'5 millones	H2N2
Gripe de Hong Kong	1968–1969	0'75 a 1 millones	H3N2
A (H1N1)	2009-	Al menos 14.711 (29/01/2010)	H1N1

Tabla In1. Pandemias de gripe más conocidas.

sus características genéticas: un genoma segmentado y ausencia de actividad correctora en su polimerasa. Estas características, junto con su alta transmisión y su amplio rango de hospedador, han hecho de estos virus uno de los patógenos conocidos que mayor morbilidad y mortalidad han causado en la historia. En diciembre de 1997 apareció en el hombre un nuevo subtipo aviar H5N1 proveniente de aves importadas de China que amenazaba con generar una nueva pandemia (Hatta et al, 2001). Sin embargo, a pesar de su elevada mortalidad, este virus no ha adquirido todavía la capacidad de transmitirse eficazmente entre humanos. Cuando aún se pensaba en la potencial pandemia de gripe aviar, un nuevo subtipo de origen porcino H1N1 se extendió desde Méjico en abril del 2009 (Neumann et al, 2009). El 29 de enero de 2010 la OMS declaró que al menos habían habido 14.711 fallecidos a nivel mundial por esta pandemia (http://www.who.int/csr/don/2010_01_29/en/index.html). Este subtipo se caracteriza por una alta transmisión entre la población humana. Esto, junto con la globalización actual, ha propiciado la expansión del virus por todo el mundo en un tiempo récord.

Actualmente, sólo dos de las proteínas virales (Neuraminidasa y la proteína M2) son diana de los medicamentos antivirales para gripe aprobados por la FDA (*US Food and Drug Administration*),

estos medicamentos son: oseltamivir, zanamivir, amantidina y rimantidina (De Clercq, 2006).

Todas estas circunstancias hacen que el estudio del virus de la gripe tanto a nivel molecular como clínico y epidemiológico sigan siendo de gran importancia.

1.2. Clasificación y nomenclatura

El virus de la gripe pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* y se caracteriza por tener envuelta lipídica y un genoma RNA segmentado de cadena sencilla y polaridad negativa. La familia *Orthomyxoviridae* incluye varios géneros: *Influenzavirus A*, que infecta humanos, otros mamíferos y gran variedad de aves; *Influenzavirus B*, que únicamente infecta humanos; *Influenzavirus C*, que infecta humanos, perros y cerdos; *Thogoto-like virus*, que incluye las especies Thogoto y Dhori, que infecta insectos; e *Isavirus*, que infecta al salmón (Palese & Shaw, 2007).

Los virus del género *Influenzavirus A* se dividen en subtipos según la naturaleza antigénica de las glicoproteínas de la envuelta hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Estos subtipos difieren en el rango de hospedador y la patogenicidad (Nicholls et al, 2008; Yamada et al, 2006). Los virus clínicamente relevantes en humanos son los de tipo A y B, siendo los del tipo A los únicos que han producido pandemias en el siglo XX. En esta Memoria se hace referencia únicamente a cepas de virus tipo A porque es el que afecta más gravemente humanos y constituye el principal modelo de estudio del laboratorio.

1.3. La partícula viral

Los viriones son pleomórficos y heterogéneos aunque con tendencia a adquirir formas esféricas o filamentosas de entre 80 y 120 nm de diámetro, dependiendo de la cepa y del tipo de célula hospedadora (Fig. In2). Las partículas virales tienen una estructura compleja y poseen una membrana lipídica derivada de la célula hospedadora. A esta envuelta se anclan las glicoproteínas virales HA y NA formando espículas radiales de 10-14 nm y la proteína M2 que proyecta de la superficie del virus (Fig. In3). Dentro de cada envuelta están los segmentos del genoma viral asociados a la nucleoproteína (NP) y la polimerasa en forma de ribonucleoproteínas (RNPs) (Noda et al, 2006; Palese & Shaw, 2007).

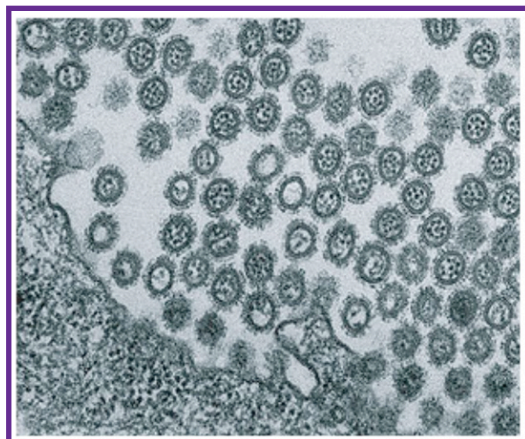


Figura In2. El virus de la gripe. Micrografía electrónica de secciones ultrafinas de partículas del virus de la gripe emergiendo de una célula infectada. Los puntos electrodensos en el interior del virión representan segmentos de las RNPs individuales (Adaptado de Noda et al, 2006).

1.3.1. Proteínas virales

Hemaglutinina (HA): La HA es una glicoproteína de membrana que forma homotrímeros de estructura alargada terminando en una forma globular. Las funciones más importantes de HA son el reconocimiento del receptor celular del

virus y la fusión con la membrana celular para permitir la entrada del virus (Weis et al, 1988).

Neuraminidasa (NA): La NA es una glicoproteína de membrana que se asocia en homotetrámeros con forma de bastón (Colman et al, 1983; Varghese et al, 1983). Su función es eliminar el ácido siálico presente en las glicoproteínas de la membrana celular para permitir la liberación de los nuevos viriones al espacio extracelular.

Proteína de membrana 2 (M2): La proteína M2 también se encuentra anclada en la envuelta del virión (Zebedee & Lamb, 1988). La estructura activa biológicamente es un tetrámero que forma un canal iónico (Bauer et al, 1999; Holsinger & Lamb, 1991; Pinto et al, 1992). Su función principal es permitir el paso de protones de los endosomas al interior del virus. También está implicada en la definición de la proporción de partículas virales filamentosas y esféricas (Roberts et al, 1998) y en el ensamblaje y liberación de viriones (Hughey et al, 1995; Schroeder et al, 2005).

Proteína de membrana 1 (M1): La proteína M1 es la más abundante en el virión y la más conservada evolutivamente. Forma una malla estructural por debajo de la envuelta lipídica que conecta los componentes del interior del virus con las proteínas de la envuelta (Nayak et al, 2004). Una de sus superficies es altamente hidrofóbica permitiendo la interacción con membranas, mientras que la superficie opuesta está cargada positivamente (Sha & Luo, 1997) y probablemente interaccione con el RNA (Ye et al, 1989; Ye et al, 1987). M1 interacciona con las RNPs y con la proteína NEP. Se ha propuesto que M1 tiene un papel clave en la formación de los viriones reclutando los componentes virales al lugar de ensamblaje en la membrana plasmática.

Proteína de exportación del núcleo (NEP) (anteriormente denominada NS2): La NEP es poco abundante en el virión, interacciona con el receptor de exportación nuclear CRM1 (Neumann et al, 2000) y con varias nucleoporinas (O'Neill et al, 1998). La NEP también interacciona con M1, lo cual sugiere que la exportación de las RNPs progenie del núcleo se realiza mediante el complejo RNP-M1-NEP (Yasuda et al, 1993).

NS1: La proteína NS1 se expresa durante la infección viral pero no se ha detectado en el virión. Es una proteína multifuncional que realiza una plétora de actividades que contribuirían a aumentar la eficiencia de replicación del virus y su virulencia durante la infección. Estas incluyen: a) regulación temporal de la síntesis de RNA viral; b) modulación del proceso de *splicing* del mRNA viral; c) aumento de la traducción de mRNAs virales; d) regulación de la morfogénesis viral; e) supresión de la respuesta inmune/apoptótica del hospedador; f) activación de la PI3K;

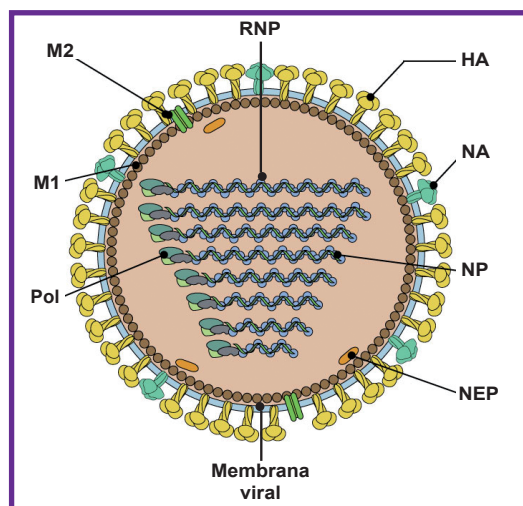


Figura In3. Representación esquemática de una partícula del virus de la gripe. El virión está compuesto por 9 de las 12 proteínas que codifica su genoma. Se muestran las 2 glicoproteínas de membrana, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), el canal iónico M2, la proteína matriz M1, la proteína NEP, las ocho RNPs (compuestas por el RNA, NP y el complejo de la polimerasa, formado por las subunidades PA, PB1 y PB2) y la membrana del virus (Adaptado de Coloma, 2009).

y g) implicación en la patogénesis dependiente de cepa. Todas estas funciones de NS1 se basan en su habilidad para participar en multitud de interacciones proteína-proteína y proteína-RNA (Hale et al, 2008).

PB1-F2: La proteína PB1-F2 se expresa durante la infección viral pero tampoco se ha detectado en el virión. Esta proteína se localiza en la membrana de las mitocondrias y se ha demostrado que induce apoptosis (Gibbs et al, 2003). Es un factor importante de patogenicidad ya que favorece la aparición de enfermedades bacterianas secundarias (McAuley et al, 2007) y además regula la actividad de la polimerasa viral (Mazur et al, 2008).

N40: La proteína N40 ha sido descubierta recientemente y se desconoce que función desempeña en el ciclo viral (Wise et al, 2009). N40 se codifica en el segmento 2 del genoma viral (**Fig. In4**) y aunque no es esencial para la replicación viral en células en cultivo, su expresión es interdependiente con las proteínas PB1 y PB1-F2.

Nucleoproteína (NP): La NP es la proteína más abundantemente sintetizada durante la infección. Su estructura está compuesta por dos dominios, cabeza y cuerpo. La región situada entre estos dominios se ha propuesto como la responsable de la unión del RNA (Ye et al, 2006). Esta región se encuentra en la superficie exterior de la RNP lo que explicaría que éstas sean sensibles a RNasas. La NP encapsida el RNA viral en la RNP, a razón de una molécula de NP cada 24 nucleótidos (Compans et al, 1972; Ortega et al, 2000). La interacción con el RNA es cooperativa y no específica de secuencia (Baudin et al, 1994; Yamanaka et al, 1990). Por otro lado, la NP interacciona con la polimerasa a través de las subunidades PB1 y PB2, pero no con PA (Area et al, 2004; Biswas et al, 1998) y es necesaria para el proceso de replicación (de la Luna et al, 1993;

Huang et al, 1990). La polimerasa libre de NP es capaz de transcribir oligonucleótidos pero no de sintetizar RNAs largos (Honda et al, 1988; Portela & Digard, 2002). Otros autores han relacionado esta proteína con el cambio de transcripción a replicación que sufre la polimerasa durante el ciclo viral, aludiendo a la necesidad de NP soluble en el ambiente para que se produzca dicho cambio (Fodor et al, 1994; Klumpp et al, 1997). Así, la NP desempeña un papel esencial en los procesos de replicación y transcripción viral (Mena et al, 1999), en la organización estructural de las RNPs y es un determinante en la regulación del transporte bidireccional de las RNPs entre núcleo y citoplasma durante la infección viral.

RNPs: Las RNPs son ribonucleoproteínas presentes en el interior de la matriz estructural del virión que conforman el genoma segmentado del virus. Estas ocho moléculas de RNA genómico codifican doce proteínas (**Fig. In4**), gracias a mecanismos de *splicing* de los segmentos 7 y 8 (Lamb & Choppin, 1979), a la utilización de una fase de lectura abierta (ORF) alternativa del mRNA del segmento 2 (Chen et al, 2001) y al uso de un codón de iniciación alternativo también en el segmento 2 (Wise et al, 2009). Las RNPs están compuestas por un segmento de RNA genómico superenrollado (Hsu et al, 1987) tapizado en toda su longitud por la nucleoproteína (**NP**) (Klumpp et al, 1997) y un complejo de polimerasa viral compuesto por tres subunidades: **PB1**, **PB2** y **PA** (Portela et al, 1999). Estas RNPs son las unidades básicas funcionales que llevan a cabo los procesos de replicación y transcripción en el núcleo de la célula infectada. La polimerasa se describe más adelante en mayor detalle.

1.3.2. Genoma viral

El genoma del virus de la gripe está formado por 8 segmentos de RNA de cadena sencilla y

polaridad negativa cuya longitud oscila entre 2341 y 890 nt (**Fig. In4**). Estos segmentos jamás existen como RNAs desnudos sino que están asociados a las cuatro proteínas virales que conforman las RNPs.

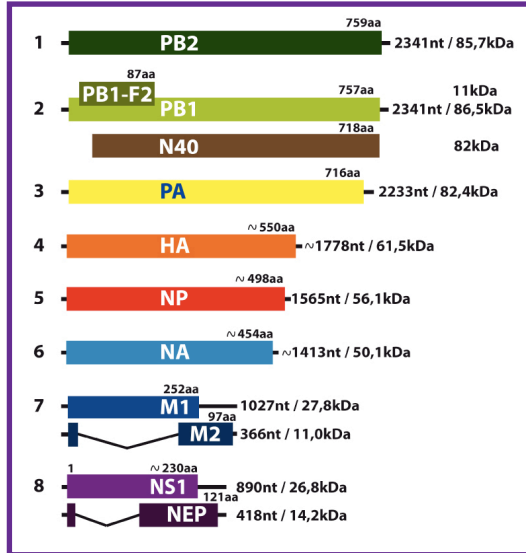


Figura In4. Estructura del genoma del virus de la gripe. Los RNAs se representan en polaridad positiva y se indican las proteínas que codifican. A la izquierda se muestra el número de segmento. A la derecha su longitud en nucleótidos y la masa molar de las proteínas que codifican. Las líneas negras simbolizan los extremos no codificantes de cada segmento. Los intrones se representan como líneas en forma de V en los segmentos 7 y 8 (Adaptado de Palese & Shaw, 2007).

1.3.2.1. El promotor viral

Cada segmento presenta unas secuencias conservadas de 12 y 13 nucleótidos en sus extremos 3' y 5', respectivamente (Desselberger et al, 1980) que poseen complementariedad parcial e invertida (**Fig. In5**). Este hecho les permite aparearse y formar una estructura a la que se une la polimerasa y conforma el promotor para los procesos de replicación y transcripción viral (Fodor et al, 1994; Fodor et al, 1993; Honda et al, 1987). Además, secuencias no conservadas dentro de las regiones no codificantes se han visto relacionadas con la regulación de la

eficiencia de transcripción/replicación (Zheng et al, 1996).

Tras el estudio de la estructura de los extremos de los RNAs mediante predicciones de plegamiento, experimentos de mutagénesis y de resonancia magnética nuclear, se han propuesto varios modelos de estructura secundaria de los promotores de vRNA y cRNA (**Fig. In5**): mango de sartén o *panhandle* (Bae et al, 2001; Baudin et al, 1994; Desselberger et al, 1980; Hsu et al, 1987; Lee et al, 2003); tenedor o *RNA-fork*, que consiste en una estructura híbrida entre RNA de cadena doble y sencilla (Fodor et al, 1995; Kim et al, 1997); y sacacorchos o *corkscrew*, basada en la de *RNA-fork* pero en la que cada uno de los extremos del RNA forma una estructura de *hairpin loop* (Flick & Hobom, 1999; Flick et al, 1996).

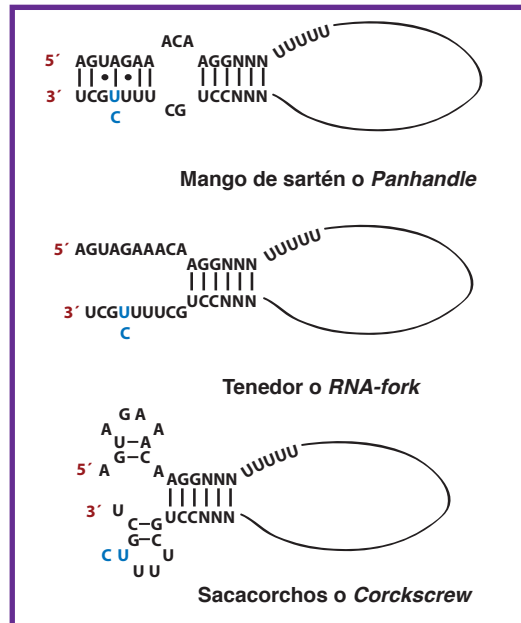


Figura In5. Modelos de la estructura secundaria propuestas para el promotor viral. Se muestran los nucleótidos conservados de los extremos 5' y 3' del RNA genómico del virus así como un segmento específico de nucleótidos (NNN). La señal de poliadenilación en el extremo 5' se muestra como una poli(U) expandida. También se indican los pares de bases Watson-Crick (Adaptado de Palese & Shaw, 2007).

La información contenida en los extremos conservados del RNA es relevante para los procesos de replicación, transcripción, poliadenilación y empaquetamiento, dado que estas estructuras están implicadas en la interacción del promotor con la polimerasa viral (Brownlee & Sharps, 2002).

1.3.2.2. RNAs virales presentes en la célula infectada

Durante la infección por el virus de la gripe se pueden encontrar tres tipos de RNAs virales distintos dentro de la célula infectada, todos ellos generados por el complejo de la polimerasa viral (**Fig. In6**):

vRNAs o RNAs genómicos: son los RNAs presentes en las RNPs paternas y los que se encapsidan para dar lugar a las RNPs progenie. Sus extremos poseen un 5'-trifosfato y un 3'-OH (Young & Content, 1971). Los vRNAs contienen además una zona rica en uridinas próxima al extremo 5', que se utiliza como molde para la poliadenilación de los mRNAs virales (Luo et al, 1991; Robertson, 1979). El vRNA siempre se encuentra encapsidado por la proteína NP

formando **vRNPs**.

cRNAs o RNAs complementarios: son una copia completa en polaridad positiva del vRNA y son producidos mediante el proceso de replicación. Los cRNAs son RNAs intermediarios de la replicación viral ya que se utilizan como molde para generar copias de vRNA que serán incorporadas más tarde a la progenie viral. Los cRNAs también se encuentra formando **cRNPs**, pero a diferencia de las vRNPs, las cRNPs no salen del núcleo de la célula infectada y no se encapsidan en los nuevos viriones. Igual que el vRNA, el promotor del cRNA tiene también una estructura de *panhandle* en los extremos, pero se han identificado diferencias estructurales entre ambos que son reponsables de una funcionalidad diferente, probablemente porque inducen un reconocimiento diferencial con la polimerasa (González & Ortín, 1999b).

mRNAs o RNAs mensajeros: son generados durante los procesos de transcripción a partir de moléculas de vRNA. Tienen polaridad positiva y presentan en sus extremos 5' una estructura *cap* tipo 1 que deriva de mRNAs celulares (Krug et al, 1979) y en sus extremos 3' una secuencia poliA de longitud variable. Dichas modificaciones

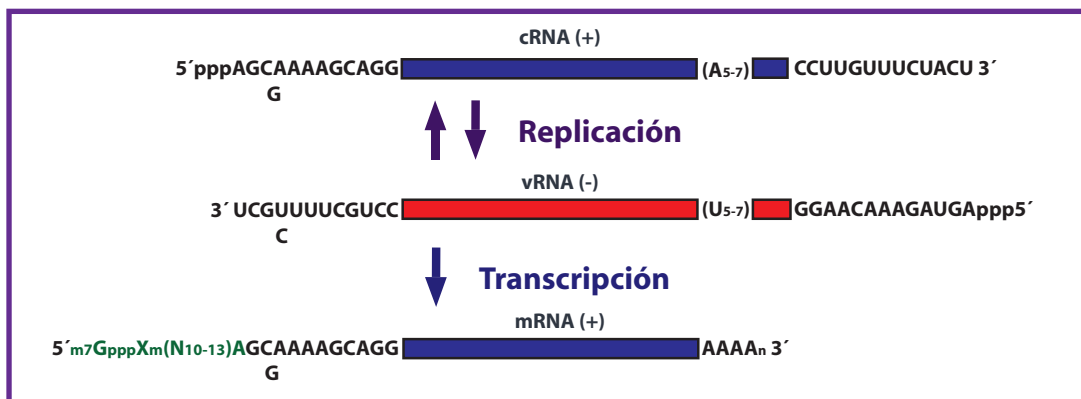


Figura In6. Diagrama de la síntesis del RNA viral. El RNA genómico de polaridad negativa (vRNAs) se muestra en medio de la figura con las secuencias no codificantes conservadas en cada extremo. Mediante un proceso de transcripción se generan los mRNAs virales. El mRNA viral contiene una estructura *cap* que proviene de pre-mRNAs celulares y un extremo poliA sintetizado por la polimerasa viral (mRNAs). Por un proceso de replicación se generan los intermediarios replicativos (cRNA) que son una copia exacta en polaridad positiva del vRNA y sirven de molde para dar lugar a la progenie viral (vRNA).

post-transcripcionales dan lugar a mRNAs virales estructuralmente indistinguibles de los celulares.

2. Ciclo de infección viral

El ciclo viral se desarrolla en células epiteliales del tracto respiratorio superior e inferior de vertebrados y presenta una duración de ocho horas, estando muy bien regulado temporal y espacialmente (**Fig. In7**).

2.1. Entrada de las partículas virales

La infección comienza con la adsorción de las partículas virales a la célula hospedadora mediada por la interacción de HA del virus con los receptores celulares que contienen ácido siálico (presente en glicoproteínas y glicolípidos) (Weis et al, 1988) (**Fig. In7-1**). La entrada ocurre por un mecanismo de endocitosis mediada por receptor y una vez formada la vesícula, se fusiona con lisosomas, acidificándose su interior y dando lugar a endolisosomas (**Fig. In7-2**). El pH del virión disminuye gracias al canal iónico formado por la proteína M2 (Helenius, 1992; Pinto et al, 1992). El pH ácido produce en el virión una desestabilización de la interacción de las RNPs con la proteína M1 y un cambio conformacional en la HA que favorece la fusión de la envuelta del virión y la membrana endolisosomal (Skehel et al, 1995; Stegmann et al, 1987a; Stegmann et al, 1987b). Todos estos eventos permiten la liberación de las RNPs al citoplasma (**Fig. In7-3**) que se dirigen al núcleo (Wang et al, 1997) donde tienen lugar los procesos de transcripción y replicación del genoma viral.

2.2. Transcripción, replicación y expresión génica

Tras la entrada de las RNPs al núcleo de la célula infectada tiene lugar un primer paso de transcripción en el que se sintetizan cantidades similares de todos los mRNAs virales a partir de las vRNPs paternas (Shapiro et al, 1987) (**Fig. In7-4**). Este paso no precisa la síntesis de nuevas proteínas virales. Los RNAs mensajeros generados son transportados al citoplasma y traducidos por la maquinaria celular (**Fig. In7-5/6**). Algunas proteínas virales sintetizadas son transportadas de vuelta al núcleo (**Fig. In7-7**) donde intervendrán en la replicación de los vRNAs. En una primera ronda de replicación se producen cantidades equivalentes de los cRNAs de cada segmento (**Fig. In7-8**). Sin embargo, la amplificación de los vRNAs a partir de estos moldes de cRNA es diferente para cada segmento (Smith & Hay, 1982). La generación de los mRNAs a partir de estos vRNAs constituye la transcripción secundaria y la acumulación y síntesis de las proteínas correspondientes son proporcionales a la acumulación del vRNA del que proceden (Hay et al, 1977; Krug, 1989; Krug et al, 1989; Smith & Hay, 1982) (**Fig. In7-4/7**). En este punto los procesos de replicación y transcripción secundaria están fuertemente acoplados. No obstante, según avanza la infección se desacoplan y las vRNPs presentes en el núcleo formarán los nuevos viriones. Los procesos de transcripción y replicación viral están mecanísticamente bien diferenciados. La iniciación de la transcripción depende de un oligonucleótido con *cap* que actúa como cebador de la polimerasa, mientras que durante la replicación la polimerasa inicia *de novo* la síntesis del RNA. La transcripción implica la terminación prematura y el proceso de poliadenilación. Por el contrario, la replicación da lugar a una copia completa y complementaria del molde utilizado (Hay et al, 1982). Además, el producto de replicación es encapsidado por

moléculas de NP (Pons, 1971), mientras que el producto de transcripción es un RNA no encapsidado. Toda la síntesis del RNA viral ocurre en el núcleo y el tráfico de entrada y salida del núcleo es un proceso altamente regulado (Cros & Palese, 2003).

2.3 Procesamiento de los RNAs virales y síntesis de proteínas

Los RNAs mensajeros virales, tras exportarse al citoplasma, deben competir con los mensajeros celulares por la maquinaria de traducción.

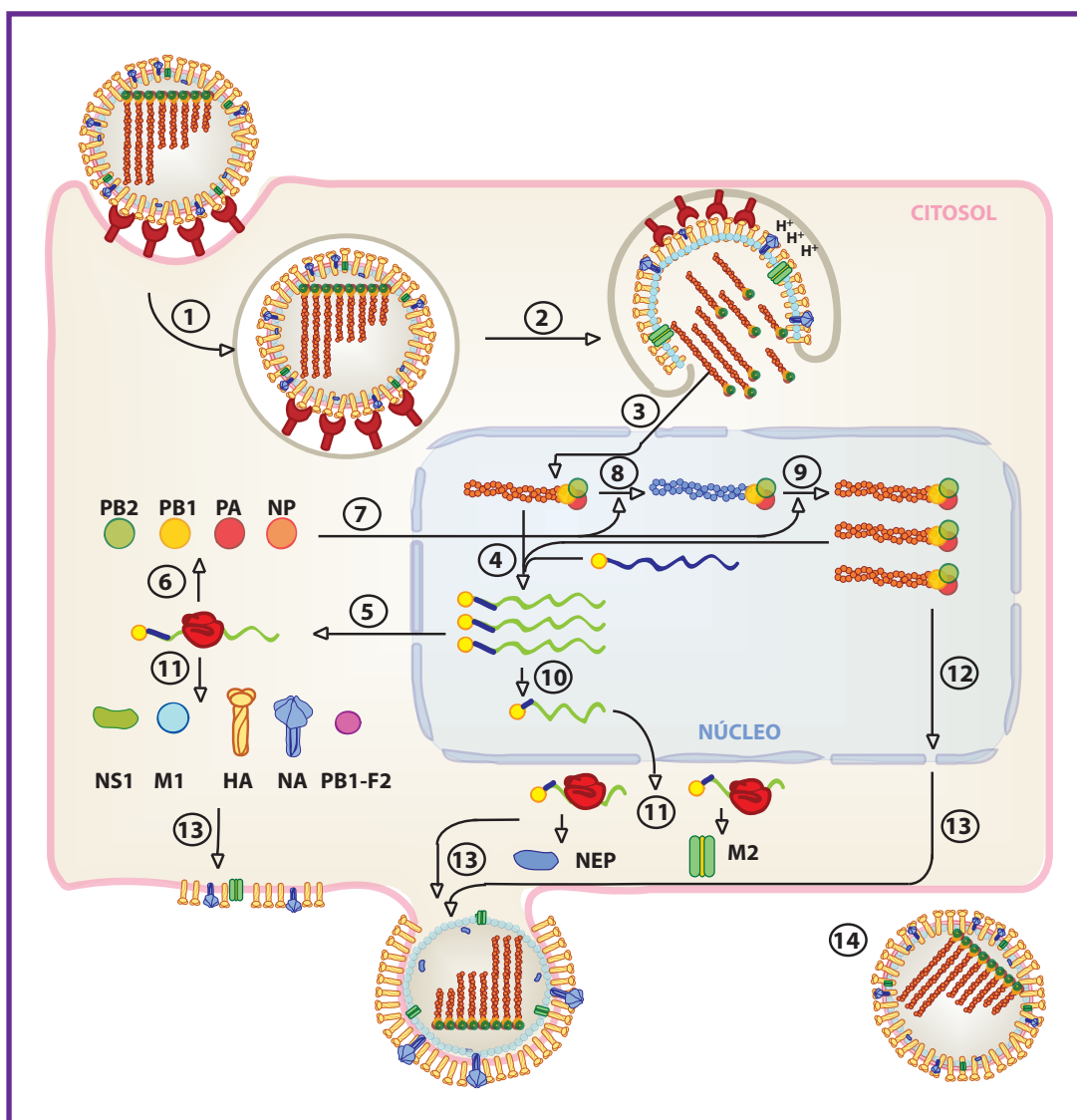


Figura In7. Ciclo de infección viral. Esquema de los pasos de la infección del virus de la gripe. Se representan los mRNAs celulares en azul, los mRNA virales en verde, las cRNPs en azul y las vRNPs en naranja. 1) Al unirse a la superficie celular, el virus es internalizado por endocitosis mediada por receptor. 2) El bajo pH del endosoma desencadena la fusión de las membranas viral y endosomal, liberando las RNP al citoplasma. 3-4) Las vRNPs se importan al núcleo, donde sirven como molde para la transcripción. 5-6) Nuevas proteínas son sintetizadas desde el mRNA viral. 8-9) En la replicación se generan los RNA intermediarios de polaridad positiva (cRNA). 12-13) Las nuevas RNP se exportan del núcleo al citoplasma y se transportan al sitio de ensamblaje, donde las partículas virales se liberan mediante gemación (Adaptado de Coloma, 2009).

Los productos de transcripción colineales del vRNA de los segmentos M y NS codifican las proteínas M1 y NS1, respectivamente. Sin embargo, estos transcritos pueden ser procesados por la maquinaria de *splicing* dando lugar a los mRNAs que codifican las proteínas M2 y NEP, respectivamente (Inglis et al, 1979; Inglis & Brown, 1981; Lamb & Choppin, 1983). Aunque es la maquinaria de *splicing* de la célula hospedadora la que elimina los intrones correspondientes en estos segmentos, la polimerasa viral regula la selección del sitio 5' de *splicing* alternativo del mRNA del segmento M (Shih et al, 1995). El proceso de *splicing* se encuentra regulado para tener controlado durante la infección la relación de los mRNAs NS1/NEP y M1/M2 en la célula (Palese & Shaw, 2007).

Los mRNAs son exportados muy eficientemente, aunque el mecanismo de exportación no está claro. La traducción la lleva a cabo la maquinaria celular (Fig. In7-10/11) y parece que el virus toma el control estimulando la traducción de los mRNAs virales e inhibiendo la expresión de los mRNAs celulares, en un proceso conocido como *shut off* (Garfinkel & Katze, 1992).

2.4. Formación de nuevas partículas virales

En la fase tardía del ciclo de infección, entre 5 y 6 hpi, comienza la formación de nuevas partículas virales. Para ello, las vRNPs que van a formar parte de la progenie viral y que han sido acumuladas en el núcleo (Fig. In7-9) deben ser transportadas al citosol a través del poro nuclear (Fig. In7-12). En este proceso intervienen NEP, la NP de las vRNPs, que interacciona con componentes del poro nuclear (Elton et al, 2001; O'Neill et al, 1998), y M1, que parece hacer de puente entre las vRNPs y NEP (Martin

& Helenius, 1991). Una vez en el citoplasma, las vRNPs viajan a la membrana plasmática a través de microfilamentos de actina (Avalos et al, 1997) (Fig. In7-13) y llegan a regiones ricas en colesterol denominadas *lipid rafts* (Ali et al, 2000) en las que previamente se han anclado las proteínas HA, NA y, en menor medida, M2 (Nayak et al, 2004; Scheiffele et al, 1999; Simpson-Holley et al, 2002) (Fig. In7-11). Se ha propuesto que la proteína M1 es la principal organizadora del ensamblaje de los nuevos viriones (Gomez-Puertas et al, 2000; Gomez-Puertas et al, 1999), aunque otros trabajos también implican a M2 en este proceso (Iwatsuki-Horimoto et al, 2006; McCown & Pekosz, 2006).

2.5. Salida de nuevas partículas virales

Las partículas virales salen de la célula por gemación o *budding*, mecanismo mediante el cual el virus adquiere la envuelta lipídica en la que se encontraban ancladas las proteínas virales de membrana (Fig. In7-13). Por último, la actividad catalítica de NA degrada el ácido siálico de los receptores y glicoproteínas virales para evitar que se agreguen los virus y permite su dispersión (Fig. In7-14).

El empaquetamiento del genoma viral requiere la incorporación de las 8 vRNPs para la generación de virus infecciosos. Existen numerosas evidencias que apoyan un modelo de empaquetamiento dirigido por el que se seleccionen las 8 vRNPs que se incorporan. Por ejemplo, cada vRNP en los viriones es equimolar (Smith & Hay, 1982), a pesar de que la relación entre ellas en la célula infectada no es igual. Recientemente se han identificado secuencias presentes en las regiones codificantes y no codificantes en los extremos 5' y 3' de todos los genes, que son necesarias para el empaquetamiento (Fujii et al, 2005; Fujii et al, 2003; Liang et al, 2005; Liang et al, 2008;

Muramoto et al, 2006; Noton et al, 2007; Watanabe et al, 2003). Además, mediante cortes seriados de viriones se ha observado una distribución constante de 7 vRNPs en forma de anillo alrededor de una RNP central (Noda et al, 2006) (**Fig. In2**). Se cree que la vRNP central corresponde al segmento de PB2 ya que sus secuencias de empaquetamiento son necesarias tanto para la incorporación de su propio vRNA como para la incorporación del resto de vRNAs durante la formación de virus infecciosos (Muramoto et al, 2006).

3. La polimerasa viral

La polimerasa viral es una RNA polimerasa dependiente de RNA (RpRd) formada por las subunidades PA, PB1 y PB2 en una relación estequiométrica 1:1:1 (Detjen et al, 1987; Digard et al, 1989; Honda et al, 1990; Kato et al, 1985) (**Fig. In8**). La masa molar del complejo es de 250 kDa aproximadamente. La subunidad PB1 forma el núcleo central de la polimerasa, dado que los primeros 25 aminoácidos del extremo N-terminal interaccionan con PA y la región C-terminal de PB1 es suficiente para interaccionar con la región N-terminal de PB2

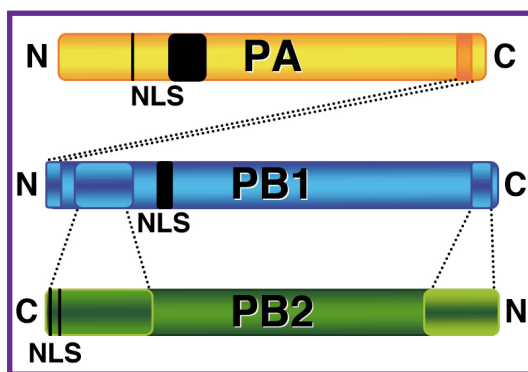


Figura In8. Dominios de interacción de las subunidades de la polimerasa viral. Se representan las tres subunidades de la polimerasa viral (PA, PB1 y PB2) y los sitios de interacción entre ellas. En negro se representan las señales de localización nuclear (NLS) descritas.

(Ohtsu et al, 2002; Pérez & Donis, 1995; Poole et al, 2007). Además, se ha descrito la interacción entre la región N-terminal de PB1 y la región C-terminal de PB2 (Biswas & Nayak, 1996; Poole et al, 2004). Recientemente, mediante ensayos de microscopía BiFC, se ha observado que el extremo N-terminal de PA es responsable de la interacción con PB2 (Hemerka et al, 2009).

Las tres subunidades son necesarias para llevar a cabo los procesos de replicación y transcripción viral en el núcleo de las células infectadas (Perales & Ortín, 1997). Además de la polimerasa presente en las RNPs, se ha descrito la presencia de polimerasa soluble en el núcleo de células infectadas (Detjen et al, 1987), aunque no se ha detectado su presencia en los viriones.

3.1. Proteína Básica 1: PB1

La subunidad PB1 es una de las dos proteínas básicas del complejo y la más conservada evolutivamente. Cataliza la adición secuencial de nucleótidos durante la elongación de la cadena de RNA (Braam et al, 1983; Ulmanen et al, 1981). Actúa como núcleo del complejo, interaccionando de manera independiente con PB2 y PA (Biswas & Nayak, 1996; Digard et al, 1989) y también con NP (Biswas et al, 1998; Medcalf et al, 1999). Posee los motivos conservados característicos de las RNA polimerasas dependientes de RNA, incluyendo la secuencia de doble aspártico invariable (S-D-D) en las posiciones 444-446 (Kobayashi et al, 1996; Poch et al, 1990), cuyas mutaciones puntuales afectan dramáticamente su actividad (Biswas & Nayak, 1994; Mahy, 1983) (**Fig. In9**). Por otra parte, PB1 posee una señal de localización nuclear (NLS) bipartita compuesta por aminoácidos básicos entre los residuos 187-195 y 203-216 (Nath & Nayak, 1990) (**Fig. In8**).

La polimerasa viral se asocia al promotor

del vRNA con especificidad de secuencia (Tiley et al, 1994) y PB1 une de manera específica y diferencial los RNAs virales (Fodor et al, 1994; Li et al, 1998) (**Fig. In9**). Concretamente, la región 5' del vRNA se une a dos regiones de PB1 situadas entre los 1-83 aa y entre los 494-757 aa. Se ha observado que PB1 interacciona con el extremo 5' del vRNA con mayor afinidad que el extremo 3', y a su vez con mayor afinidad por vRNA que por cRNA. Sin embargo, los extremos 5' y 3' del cRNA unen PB1 con la misma afinidad, sugiriendo un cambio conformacional de la proteína para la unión de vRNA o de cRNA (González & Ortín, 1999a; González & Ortín, 1999b). Se ha sugerido que la subunidad PB1 podría tener un papel en la regulación de la transcripción porque mutaciones en esta subunidad afectan a la unión al promotor viral del vRNA y a la unión a RNA con estructuras *cap* (Kerry et al, 2008).

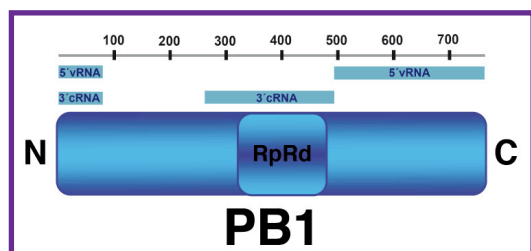


Figura In9. Subunidad PB1 de la polimerasa. El dominio característico de las RpRd se encuentra en el centro de la proteína. Las regiones de PB1 responsables de la interacción con el 5' vRNA comprenden los residuos 1-83 y 494-757. La interacción con el cRNA se da mediante los residuos centrales 266-493 aunque también están implicados los residuos 1-83.

3.2. Proteína Ácida: PA

Los primeros datos relativos a PA asignaban a esta subunidad funciones de ayuda o apoyo, aunque se desconocía su función específica. Se han descrito mutaciones que afectan tanto transcripción como replicación, indicando un papel en ambos procesos (Fodor et al, 2002; Fodor et al, 2003; Huarte et al, 2003). Se ha

observado que PA está implicada también en la unión de la polimerasa a estructuras *cap* y que es necesaria para la estabilización de la interacción entre el promotor y la polimerasa (Hara et al, 2006; Lee et al, 2002). Se ha descrito que PA interacciona con el extremo 5' del vRNA (Fodor et al, 1994) y con el cRNA (Maier et al, 2008). PA tiene actividad proteolítica sobre sí misma y sobre las proteínas que se expresan con ella (Sanz-Ezquerro et al, 1995). Esta proteína posee una NLS dividida en dos regiones situadas en el extremo N-terminal (Nieto et al, 1994) (**Fig. In8**).

3.3. Proteína Básica 2: PB2

La subunidad PB2 tiene un papel fundamental en la iniciación de la transcripción ya que es la responsable del reconocimiento de estructuras *cap* tipo 1 de los pre-mRNAs de la célula huésped, que serán posteriormente cortadas y utilizadas como cebadores para la síntesis de los mRNAs virales (Blaas et al, 1982; Ulmanen et al, 1981). Sin embargo, en la literatura han habido discrepancias sobre la posición del sitio de unión a *cap* (**Fig. In10A**). En 1999, se hizo un estudio en el que se incubaban RNPs purificadas de viriones con un oligonucleótido con *cap* marcado y, tras hacer un *crosslinking*, se digería con proteasa V8, concluyendo que había dos regiones de unión a *cap* entre los aminoácidos 242-282 y 538-577 de PB2 (Honda et al, 1999). Posteriormente, otro grupo hizo el mismo tipo de ensayo pero partiendo de polimerasa recombinante sobrexpresada y propusieron la región entre los aminoácidos 533-564 (Li et al, 2001). Un tercer estudio basado en mutagénesis dirigida de los residuos más conservados en distintas cepas de gripe identificó dos residuos aromáticos (F363 y F404) como esenciales para la unión a *cap* y se propuso que actuaban como un “sándwich aromático” similar al que se ha descrito para otras proteínas que unen *cap* (eIF4E, CBC y VP39

de virus *Vaccinia*) (Fechter & Brownlee, 2005; Fechter et al, 2003). La proteína PB2, además de estar implicada en transcripción, tiene también un papel en la replicación viral dado que mutaciones puntuales en esta proteína dan lugar a defectos en la replicación pero no en la transcripción (Gastaminza et al, 2003).

et al, 1993).

Por otro lado, PB2 posee una NLS bipartita localizada entre los aminoácidos 736-759 (Mukaigawa & Nayak, 1991). La estructura precisa de esta región ha sido recientemente determinada mediante análisis de un co-cristal con importina $\alpha 5$ (Tarendeau et al, 2007) (Fig. In10B).

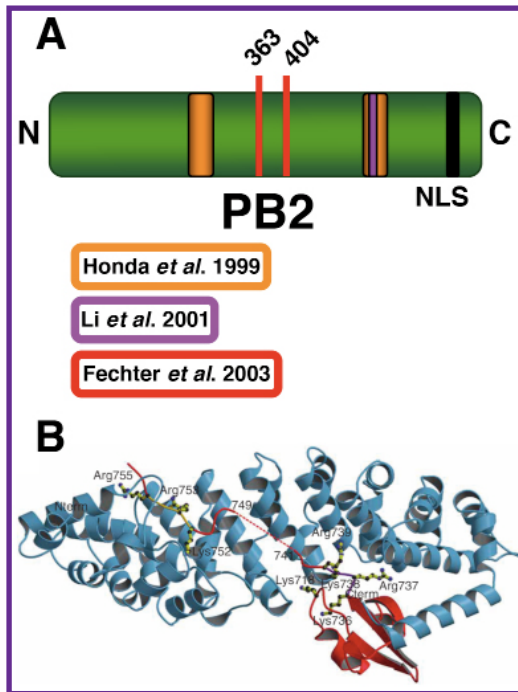


Figura In10. Subunidad PB2 de la polimerasa. A) Representación de la proteína PB2. La controversia del sitio de unión a *cap* en PB2 se representa destacando los residuos identificados como responsables de la unión a *cap* en tres estudios distintos con diferente color, naranja (Honda et al, 1999), morado (Li et al, 2001) y rojo (Fechter et al, 2003). **B)** Estructura atómica del fragmento C-terminal de PB2 que contiene la NLS (en rojo) acomplejado con la importina $\alpha 5$ (en azul) (Adaptado de Tarendeau et al, 2007).

El reclutamiento de la proteína PB2 al complejo de la polimerasa se realiza por interacciones proteína-proteína con PB1, interaccionando también directamente con NP y con PA (Biswas et al, 1998; Digard et al, 1989; Hemerka et al, 2009; Poole et al, 2004). Al igual que PB1, PB2 es capaz de unir el RNA genómico, aunque se desconoce la región responsable del reconocimiento (Fodor

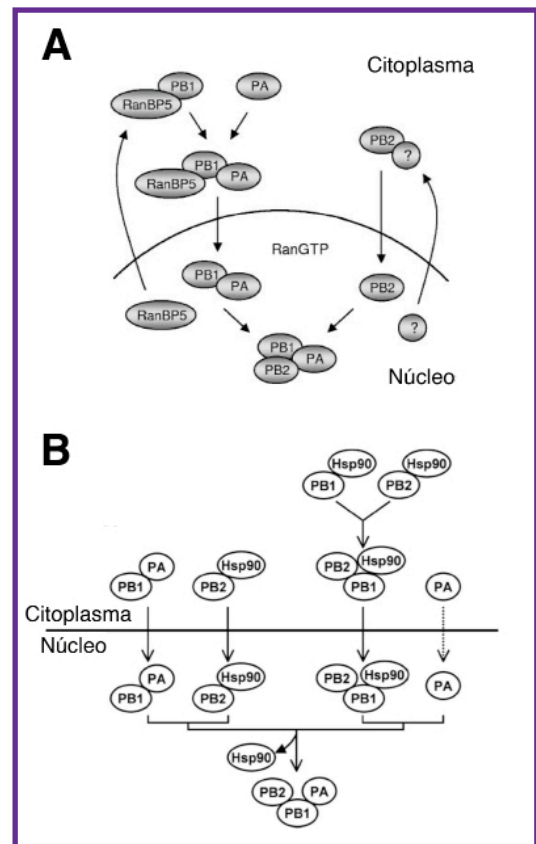


Figura In11. Modelos para el ensamblaje de la polimerasa del virus de la gripe. A) El dímero PB1-PA se forma en el citoplasma y se importa al núcleo. PB2 se transporta independientemente y el complejo heterotrimérico se forma en el núcleo (Adaptado de Deng et al, 2006a). **B)** La interacción entre las tres subunidades de la polimerasa y posterior formación de complejo está mediado por su interacción con la proteína Hsp90 (Adaptado de Naito et al, 2007a).

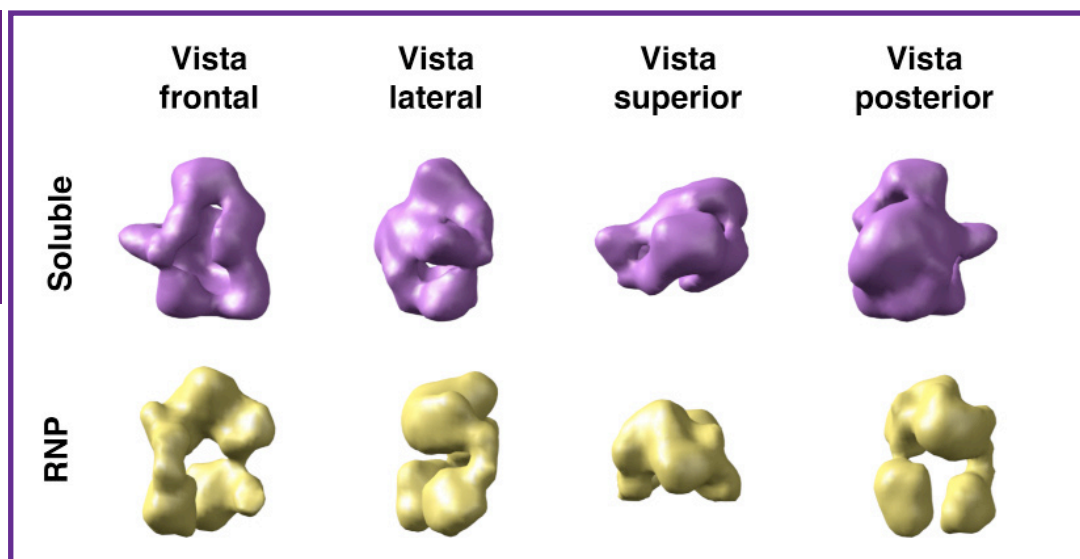


Figura In12. Modelos tridimensionales de la polimerasa viral soluble libre de RNA (en morado) (Torreira et al, 2007) y de la polimerasa presente en la RNP (en amarillo) (Coloma et al, 2009).

3.4. Ensamblaje de la polimerasa viral

Cada subunidad de la polimerasa puede traslocarse al núcleo porque todas contienen NLSs. Sin embargo, el lugar intracelular y la manera en que se produce el ensamblaje de la nueva polimerasa sintetizada aún no está bien definido. Se ha propuesto que el dímero PB1-PA se formaría en el citoplasma y sería transportado al núcleo, mientras que PB2 sería traslocada de forma independiente (Deng et al, 2006a; Fodor & Smith, 2004) (Fig. In11A). El dímero PB1-PA y PB2 formarían entonces el heterotrímero en el núcleo, tal como respaldan ensayos realizados *in vitro* (Deng et al, 2005). Otros modelos alternativos se basan en la formación de complejos de la proteína Hsp90 con PB1 y PB2 y sugieren la formación independiente de los dímeros PB1-PB2 y PB1-PA y su co-transporte al núcleo (Naito et al, 2007b) (Fig. In11B).

3.5. Estructura y oligomerización de la polimerasa viral

La estructura tridimensional de la polimerasa

biológicamente activa se ha resuelto mediante microscopía electrónica e indica que las 3 subunidades se encuentran asociadas y formando una estructura compacta (Coloma et al, 2009; Martín-Benito et al, 2001; Torreira et al, 2007). Se han obtenido dos modelos, uno correspondiente a la polimerasa soluble libre de RNA y otro del complejo de la polimerasa formando parte de la RNP (Fig. In12). A pesar de que las características generales entre ambas son muy similares, presentan ciertas diferencias estructurales que podrían deberse a un cambio conformacional inducido por la interacción de la polimerasa con NP y el RNA viral. La cristalización del complejo de la polimerasa no ha sido posible de momento.

La polimerasa del virus de la gripe es capaz de formar oligómeros intracelularmente (Jorba et al, 2008a). En ensayos de filtración en gel de complejos de polimerasa viral recombinante se observa que forma agregados de tamaño equivalente a dímeros y trímeros del complejo de polimerasa (Fig. In13).

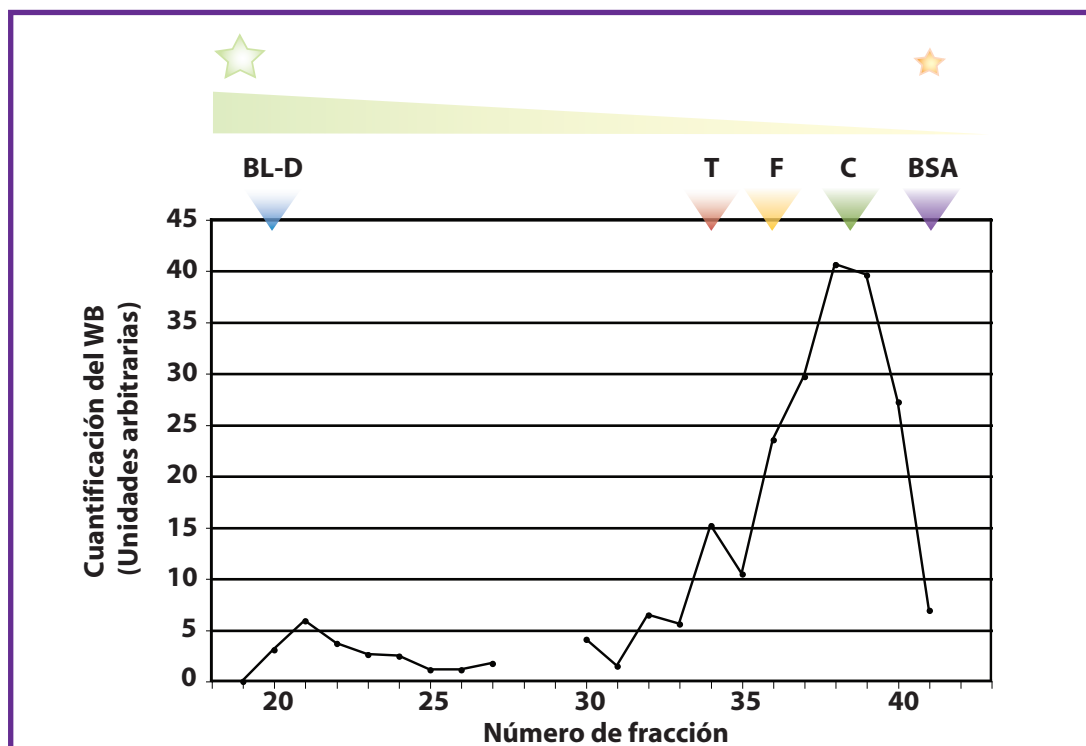


Figura In13. Oligomerización de la polimerasa. Ensayo de filtración en gel de complejos purificados de polimerasa viral recombinante. Se calibró la columna con los marcadores de peso molecular indicados en la parte superior del panel: BL-D, azul dextrano; T, tiroglobulina (670kDa); F, ferritina (440kDa); C, catalasa (220kDa); BSA, seroalbúmina bovina (68kDa) (Adaptado de Jorba et al, 2008).

4. Proceso de replicación del virus de la gripe

La replicación ocurre mediante un proceso de dos pasos. Primero se sintetiza una copia completa del vRNA en polaridad positiva denominado cRNA y a continuación éste es usado como molde para producir más vRNA (Fig. In6).

Los cRNAs y vRNAs son iniciados *de novo* y tienen un trifosfato en su extremo 5', siendo ATP el primer nucleótido incorporado en todos los RNAs virales (Hay et al, 1982). Para que tenga lugar la replicación es necesario que se hayan acumulado proteínas virales, principalmente NP (Barrett et al, 1979). Se cree que la NP aumenta la procesividad de la polimerasa durante la replicación (Honda et al, 1988) y

resulta imprescindible para superar la señal de poliadenilación (Beaton & Krug, 1986). Durante la infección viral la cantidad de cRNA sintetizado es inferior a la de vRNA y a tiempos tardíos de la infección la relación entre los vRNAs de los distintos segmentos no es equivalente. Gracias a esta regulación, durante la infección pueden expresarse proteínas tempranas (NP y NS1) y proteínas tardías (NS2, M1, M2, HA y NA). A diferencia de las vRNPs, las cRNPs no salen del núcleo durante la infección, lo que estaría de acuerdo con que la replicación esté asociada a la matriz nuclear (López-Turiso et al, 1990).

Recientemente se ha demostrado que una polimerasa distinta de la que replica es capaz de encapsidar los RNAs sintetizados para la generación de las RNPs progenie, y que una polimerasa en *trans* es responsable

de la síntesis viral en el paso de cRNA a vRNA (Jorba et al, 2009). Con estos resultados los autores han propuesto un nuevo modelo de replicación para el virus de la gripe (Fig. In14A).

Para el inicio de la replicación, la polimerasa no residente en la RNP debe tener acceso al extremo 3' del cRNA. Este paso podría estar mediado por la interacción entre polimerasas

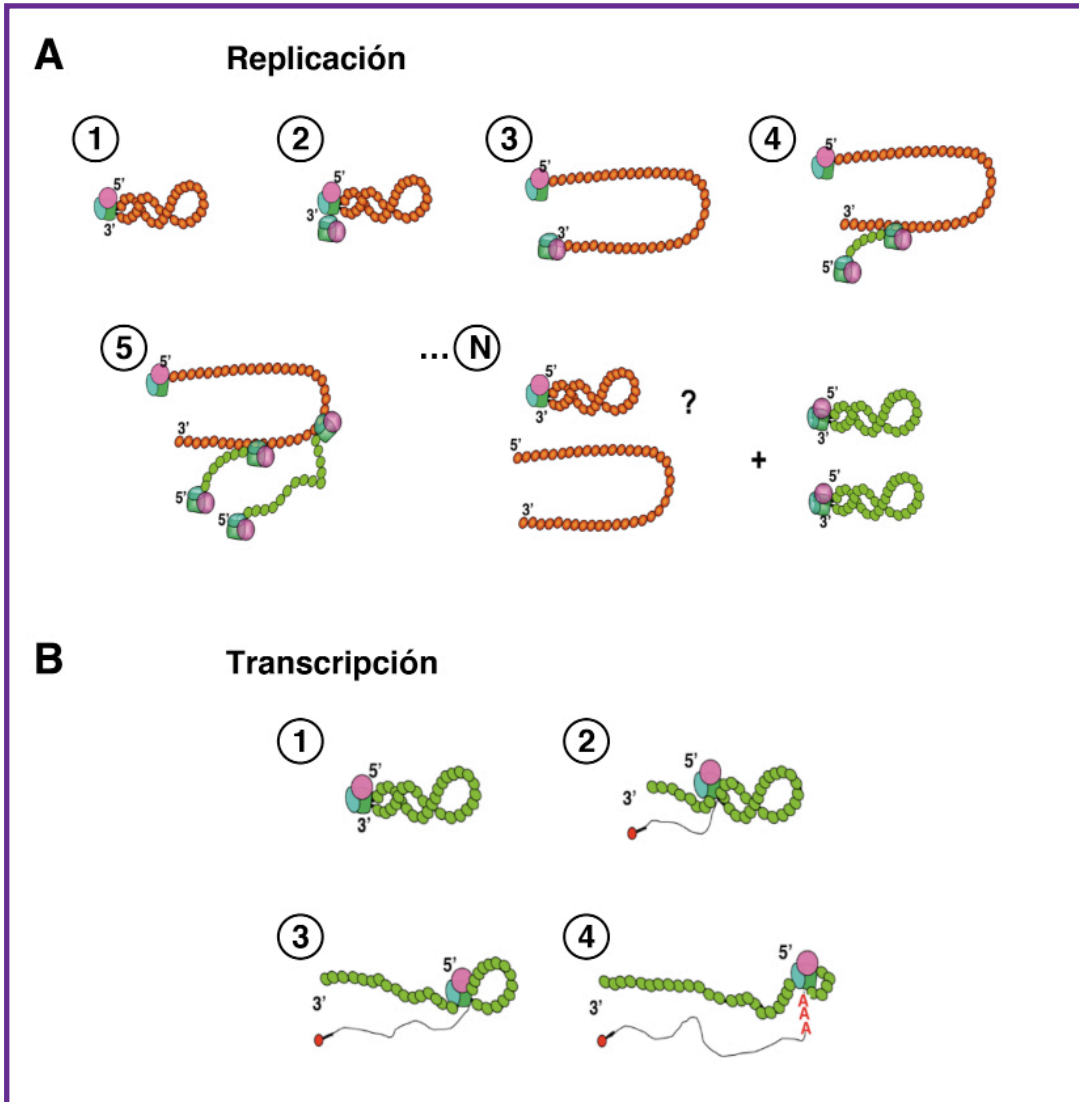


Figura In14. Diagrama de los procesos de replicación y transcripción virales. A) Modelo de replicación en *trans*. Se muestran los sucesivos pasos de la replicación de las cRNPs (en naranja) para dar lugar a vRNPs progenie (verde). La polimerasa paterna se representa en colores sólidos mientras que la polimerasa soluble de nueva síntesis se representa en colores semitransparentes. 1) vRNP con los dos extremos del vRNA unidos a la polimerasa. 2) La presencia de NP y polimerasa solubles activan la replicación viral. 3) Reconocimiento del extremo 3' por la polimerasa soluble. 4) Elongación de la replicación y protección del RNA por moléculas de NP. Unión del extremo 5' a otra polimerasa soluble. 5) Plataforma de síntesis cooperativa de RNA en la que encontramos varias polimerasas solubles replicando al mismo tiempo. 6) Productos de la replicación viral, las cRNPs (en naranja) y vRNPs (en verde). **B) Modelo de transcripción en *cis*.** 1) El *panhandle* preformado estimula la unión a estructuras *cap* de mRNAs celulares activando el complejo de la polimerasa residente que produciría el corte endonucleotídico. 2-3) Elongación del mRNA viral. 4) Poliadenilación y terminación de la transcripción (Adaptado de Jorba et al, 2009).

descrita anteriormente (Jorba et al, 2008a). Una vez la polimerasa soluble ha entrado a formar parte de complejo cRNP empieza la síntesis del vRNA. Cuando el extremo 5' del nuevo RNA queda accesible, es protegido por un complejo soluble de polimerasa distinto del que replica y por moléculas de NP. La interacción de varios complejos de polimerasa podrían formar una estructura en la que una sola molécula de cRNA-NP se moviera en dirección 3'-5' y se replicara muy eficazmente gracias a esta disposición. Estas estructuras se han observado en otros virus como Poliovirus (Hobson et al, 2001; Lyle et al, 2002) y HCV (Qin et al, 2002; Wang et al, 2002), donde sus polimerasas actúan de modo cooperativo para la síntesis de RNA. Un paso que queda sin resolver es cómo la polimerasa puede pasar de largo por la señal de poliadenilación y realizar una copia completa del cRNA, ya que el extremo 5' del molde tiene unida la polimerasa paterna. Una opción sería que las polimerasas no residentes que sintetizan el RNA pudieran desplazar y reemplazar de forma transitoria o permanente la polimerasa residente para la copia completa del molde y además proteger el extremo 5' de su degradación. Tras la replicación, el RNA paterno sería encapsidado por la polimerasa no residente (si el reemplazo fuera transitorio) o quedaría linealizado (si el reemplazo fuera permanente). Este modelo debería ser posible también para la replicación del cRNA a partir de vRNA, pero de momento no ha podido ser demostrado. Por otro lado, se han descrito experimentos que sugieren que parte de la replicación de vRNA a cRNA podría ocurrir en *cis* (Vreede & Brownlee, 2007; Vreede et al, 2004).

5. Proceso de transcripción del virus de la gripe

Recientemente se ha propuesto que la misma

polimerasa unida al RNA molde es la que cataliza la reacción de transcripción, sugiriendo un nuevo modelo de la transcripción de las RNPs en *cis* (Jorba et al, 2009) (Fig. In14B). Una vez en el núcleo, la polimerasa viral de las vRNPs reconoce las estructuras *cap* de los pre-mRNAs celulares y mediante un proceso denominado de *cap-snatching* los corta generando cebadores de 9-15 nt con extremos 5'-*cap* y 3'-OH que usa para la iniciación de la transcripción (Krug et al, 1979; Plotch et al, 1981) (Fig. In15). Se ha observado que el corte del pre-mRNA celular se

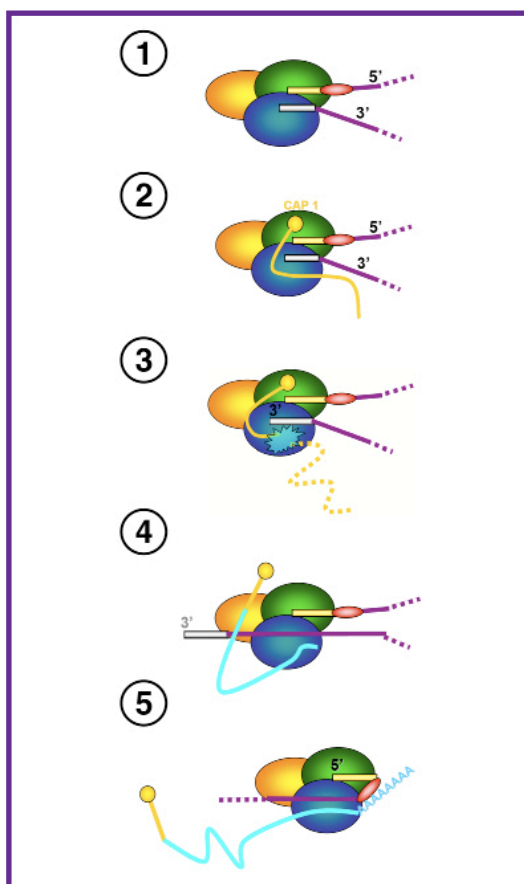


Figura In15. Modelo detallado del proceso de *cap-snatching* durante la transcripción del RNA viral. En amarillo se representa PA, en verde PB2 y en azul PB1. 1) La polimerasa está unida al promotor viral constituido por los extremos del vRNA. 2) El *cap* del pre-mRNA (en amarillo) celular se une a PB2. 3) Se corta el pre-mRNA tras 9-15 nt (*cap-snatching*). 4) Elongación del mRNA viral por la actividad polimerizante de PB1. 5) Poliadenilación del nuevo mRNA viral.

produce de manera preferencial después de una secuencia CA, siendo una G el primer nucleótido en incorporarse en todos los segmentos virales (Hagen et al, 1995; Plotch et al, 1981; Rao et al, 2003). La polimerasa viral lleva a cabo la elongación del cebador y permanece unida al extremo 5' del molde durante todo el proceso dando lugar a una estructura en forma de nudo corredizo que iría disminuyendo de longitud hasta que la polimerasa llega a la señal de poliadenilación (oligo-U). Debido al impedimento estérico, la polimerasa rebotaría sobre la secuencia de uridinas promoviendo su copia reiterada y generaría una secuencia 3' terminal de poliA (Jorba et al, 2009; Poon et al, 1998; Pritlove et al, 1999). Estos mRNAs resultantes son copias incompletas del vRNA molde.

La transcripción viral está acoplada obligatoriamente a la transcripción celular y drogas como la α -amanitina o la actinomicina D, que inhiben la RNA-Polimerasa II (RNAPII), inhiben también la transcripción viral (Rott & Scholtissek, 1970).

5.1. Otros bolsillos de unión a *cap* descritos: CBC, eIF4E y VP39

La mayoría de los mRNAs celulares y de virus eucariotas tienen una estructura *cap* en el extremo 5' que es crítica para su traducción eficiente. Las estructuras *cap* también participan en el transporte del mRNA del núcleo al citoplasma y además protegen los mRNAs de la degradación por 5' exonucleasas. La función del *cap* está mediada por proteínas de unión a *cap*. Actualmente hay otras tres proteínas capaces de unir estructuras *cap* cuya estructura atómica ha sido determinada. Estas son la proteína eIF4E que está implicada en el inicio de la traducción celular (Tomoo et al, 2003), CBC (*cap binding complex*) que es un complejo de proteínas

nucleares (Calero et al, 2002; Mazza et al, 2002) y VP39 de *Vaccinia* (Hodel et al, 1998; Tomoo et al, 2003) (Fig. In16). Los resultados sugieren que estas tres proteínas de unión a *cap*, que no están relacionadas evolutivamente, han adquirido un bolsillo de unión a *cap* común por convergencia evolutiva (Fechter & Brownlee, 2005). En este bolsillo, la estructura *cap* queda encajonada entre dos residuos aromáticos. Además, hay un

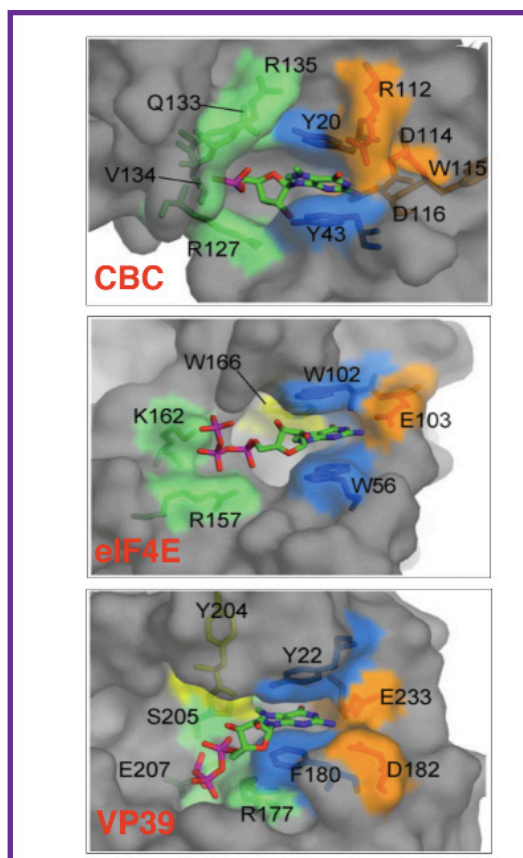


Figura In16. Bolsillos de unión a *cap* descritos. Estructura atómica de los bolsillos atómicos de tres proteínas que unen *cap*: CBC (complejo de unión a *cap* del núcleo celular), eIF4E (proteína citoplasmática implicada en el inicio de la traducción celular) y VP39 de *Vaccinia* que reconoce sus propios mRNAs con *cap*. Dentro del bolsillo se observa el análogo de *cap* encajonado entre dos residuos aromáticos (en azul) permitiendo fuertes interacciones entre el anillo de electrones π y la base de carga positiva. Además, un residuo ácido (en naranja) suele estar implicado en el reconocimiento de la base y neutraliza la carga, mientras que residuos básicos (en verde) están implicados en la estabilización del trifosfato (Adaptado de Fechter & Brownlee, 2005).

área ácida que acomoda la carga positiva del m^7G y un área básica que acomoda el trifosfato de la estructura *cap*.

6. Factores celulares asociados a la polimerasa

Los virus son parásitos obligados de su célula hospedadora debido a la carencia de componentes para completar su ciclo vital de manera independiente. El virus de la gripe lleva a cabo numerosos procesos dentro de la célula infectada que implican poner a su servicio la maquinaria celular. Para ello necesita establecer interacciones con factores celulares de distinta naturaleza y función.

Los primeros estudios que buscaban proteínas celulares que interaccionaran con el virus de la gripe, utilizaron técnicas de doble híbrido en levaduras o co-inmunoprecipitaciones (Digard et al, 1999; Engelhardt et al, 2005; Huarte et al, 2001; Momose et al, 2002; Wang et al, 1997). Posteriormente, se han empleado abordajes de tipo proteómico para identificar factores celulares asociados a las RNPs o a la polimerasa viral (Jorba et al, 2008b; Mayer et al, 2007). Se han descrito proteínas asociadas que intervienen en diversos procesos de la transcripción celular, como RNAP II (Engelhardt et al, 2005), hCLE (Huarte et al, 2001), Ebp-1 (Honda et al, 2007), PARP-1, DDB1 (Mayer et al, 2007), NXP2 y DDX5 (Jorba et al, 2008b). Algunos trabajos han mostrado interacciones de proteínas virales con proteínas de la cromatina, como CHD6 que pertenece a una familia de remodeladores de cromatina (Huarte et al, 2001), o con el nucleosoma a través de las colas N-terminales de las histonas (García-Robles et al, 2005). También se han descrito asociaciones del virus con la maquinaria de *splicing* celular, como por ejemplo la interacción entre NP y UAP56

(Momose et al, 2001), y la polimerasa con SFPO/PSF, hnRNP M y hnRNP H1 (Jorba et al, 2008b). Algunas proteínas que se han descrito como asociadas a factores virales tienen funciones relacionadas con la importación y exportación de factores al núcleo, como la importina $\alpha 1$ (NPI-1) (O'Neill et al, 1995) y la importina $\alpha 2$ (NPI-3) (Wang et al, 1997) que interaccionan con NP y que participan en el transporte al núcleo de las RNPs; la importina $\beta 3$ (RanBP5) que interacciona con PB1 (Deng et al, 2006a), y la importina $\alpha 5$ con PB2 (Tarendeau et al, 2007) (**Fig. In10B**). También se han descrito interacciones de la RNP viral con estructuras de la periferia nuclear y componentes de la vía de exportación de CRM1, como la propia CRM1, importina- α , fibras de actina, proteínas Mx y la RNA helicasa DDX3 (Digard et al, 1999; Elton et al, 2001; Engelhardt et al, 2004; Jorba et al, 2008b; Ma et al, 2001). Otros factores que interaccionan con proteínas virales están implicados en traducción, como el complejo de iniciación de la traducción celular (Burgui et al, 2003) o la proteína S3 de la subunidad 40S del ribosoma que interacciona con la polimerasa viral (Jorba et al, 2008b). Se han descrito interacciones con proteínas de la familia de las HSP (heat shock proteins), como HSP90 que interacciona con PB2 y PB1 (Momose et al, 2002) y HSP70 que se asocia a las RNPs (Hirayama et al, 2004). Varios estudios han documentado interacciones de proteínas virales con componentes del citoesqueleto celular que podrían facilitar el transporte de proteínas y RNPs en distintos momentos del ciclo viral, como NP con filamentos de F-actina (Digard et al, 1999) y la polimerasa viral con β -tubulina (Jorba et al, 2008b).

Más recientemente, se han utilizado técnicas de silenciamiento genómico de alto rendimiento para encontrar más factores celulares implicados en el ciclo viral (Karlás et al, 2010; König et al, 2010; Shapira et al, 2009). Los distintos autores de estos análisis coinciden en que aunque se

proporciona mucha información novedosa, son necesarios estudios concretos para conocer la relevancia de cada uno de las proteínas celulares identificadas. Así, se han encontrado evidencias *in vitro* e *in vivo* que indican que disminuciones de CLK1 o de la proteína supresora de tumores p27 provocan una reducción de la replicación viral (Karlás et al, 2010). Además, se analizó la relevancia de la proteína de unión a DNA SON para el correcto tráfico de viriones durante la infección. También se caracterizaron factores involucrados en la entrada viral, incluyendo el complejo COPI, FGFR y GSK3B, y algunos implicados en pasos posteriores del ciclo, como CAMK2B y PRSS35 (Konig et al, 2010).

7. Microscopía electrónica y procesamiento digital de imágenes individuales

En los últimos años se ha podido apreciar un incremento notable en la cantidad de trabajos publicados en los que se ha empleado la microscopía electrónica (ME) y el procesamiento de imágenes para determinar la estructura de macromoléculas. Es una técnica útil porque no compite con otras metodologías más establecidas (por ejemplo cristalografía y RMN), sino que aporta aspectos complementarios. Una de las principales ventajas es que la cantidad de muestra necesaria en microscopía es mucho menor que la requerida en las otras dos técnicas. Esta característica abre el campo al estudio de numerosos complejos macromoleculares

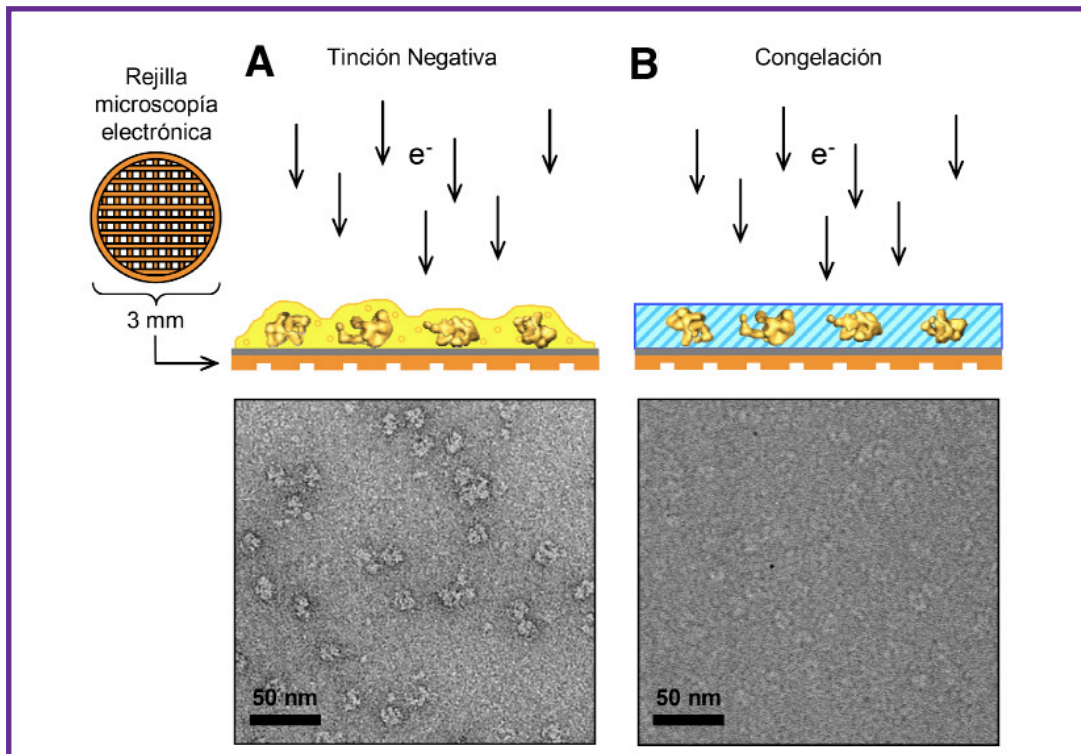


Figura In17. Técnicas de preparación de muestras para su análisis mediante ME y procesamiento digital de imágenes individuales. A) **Tinción negativa:** el espécimen queda embebido en una matriz amorfa correspondiente al agente de tinción deshidratado. B) **Congelación:** las moléculas individuales del espécimen quedan atrapadas en una fina capa de hielo amorfo que preserva su conformación nativa. Se pueden apreciar las diferencias de contraste al comparar micrografías electrónicas de un mismo espécimen usando una u otra técnica (Adaptado de Rivera-Calzada, 2008).

cuyas purificaciones suelen ofrecer bajos rendimientos.

No hay límite superior en el tamaño de las macromoléculas que pueden ser analizadas mediante ME e incluso en muchos casos una gran masa molecular puede facilitar el trabajo. Una tercera ventaja es que permite lidiar, hasta cierto punto, con muestras heterogéneas. Si bien esto sigue siendo un reto metodológico, se están desarrollando nuevos algoritmos y procedimientos capaces de resolver la estructura 3D de mezclas de conformaciones presentes en una misma muestra (Burgess et al, 2004; Kastner et al, 2008; Leschziner & Nogales, 2006; Penczek et al, 2006; Scheres et al, 2007; White et al, 2004).

El mayor inconveniente de esta técnica es que la resolución que se suele alcanzar es baja (15-30 Å). Aunque es cierto que cada vez aparecen más trabajos en los que la resolución que se consigue es media-alta (9-4 Å), estos casos suelen corresponder a muestras que poseen gran simetría intrínseca y gran tamaño, como la chaperona GroEL y algunos virus (Jiang & Ludtke, 2005; Zhang et al, 2008; Zhou, 2008). Esta diferencia en la resolución obtenida en las estructuras resueltas mediante ME y las de cristalografía y RMN, ha impulsado a muchos grupos a realizar un gran esfuerzo en el desarrollo de metodologías que permitan combinar datos a distinta resolución. La más extendida es el encaje de estructuras de proteínas o dominios resueltos a resolución atómica en los mapas de las proteínas o complejos proteicos obtenidos por ME. El objetivo es interpretar los datos de ME a mayor resolución.

7.1. Introducción al microscopio electrónico

Los principios básicos que rigen el

funcionamiento del microscopio electrónico de transmisión son análogos a los de un microscopio óptico convencional. En el caso del microscopio electrónico se utiliza como fuente de iluminación los electrones que se generan a partir de un filamento o cátodo con un voltaje de aceleración determinado. Los electrones interactúan con la muestra y a continuación, gracias a bobinas electromagnéticas que aprovechan la carga de los electrones, forman una imagen del espécimen a mayor magnificación (Bozzola, 1992). Los electrones al interactuar con la muestra son dispersados dando lugar a la aparición del contraste en la imagen (Frank, 2006). Los electrones tienen una longitud de onda considerablemente menor que la luz visible y por tanto permiten alcanzar una resolución subatómica.

7.2. Técnicas de preparación del espécimen

El interior del microscopio electrónico se encuentra a alto vacío (10^{-4} - 10^{-7} Pa), de modo que los electrones pueden avanzar sin colisionar con ninguna otra molécula que no pertenezca al espécimen. Esta característica condiciona la preparación de la muestra para su posterior observación en el ME. Las diferentes técnicas de preparación han de evitar que el espécimen colapse cuando se introduce en la columna del ME y, en la medida de lo posible, han de protegerlo del daño causado por los electrones. Se emplean principalmente dos técnicas de preparación de la muestra: congelación (Dubochet et al, 1988) y tinción negativa (Ohi et al, 2004) (Fig. In17).

En la congelación, la muestra se observa embebida en su propio tampón a temperaturas del orden de -180 °C. Gracias a la rapidez con que se lleva a cabo la congelación se consigue que el agua presente en la muestra forme hielo amorfo evitando el daño irreversible que

provocaría la formación de cristales de hielo. De este modo la macromolécula se encuentra en su estado nativo y en casos favorables pueden resolverse estructuras a media-alta resolución. La desventaja es que las imágenes obtenidas tienen muy poco contraste por lo que se requiere que la macromolécula sea de gran tamaño para poder analizarse con esta técnica (generalmente superior a 500 kDa) (**Fig. In17A**). La preparación y posterior observación de muestras congeladas en el ME es lo que se denomina criomicroscopía.

La tinción negativa permite estudiar muestras de menor tamaño. En este caso la muestra se tiñe con sales de metales pesados (formiato y acetato de uranilo son los más utilizados) para conseguir un mayor contraste (**Fig. In17B**). La desventaja de esta técnica es que no se observa directamente la proteína, sino el molde que deja en la capa de tinción (de ahí el nombre del método), de manera que la resolución que se puede alcanzar viene limitada por el tamaño del grano del agente de tinción.

En la preparación de la muestra, la cantidad de electrones que la pueden atravesar sin dañarla en exceso es limitada, lo que hace que las imágenes obtenidas tengan gran cantidad de ruido. Esto, junto con otras aberraciones que introduce el microscopio, dificulta el estudio de la estructura de la macromolécula.

7.3. Obtención de micrografías

La toma de micrografías debe hacerse usando la técnica denominada “mínima dosis” según la cual el área de interés se expone una sola vez a alta magnificación (50.000 aumentos) (Williams & Fisher, 1970). Las micrografías tomadas en el microscopio electrónico son proyecciones de la molécula observada en la dirección del haz de electrones. Estas imágenes integran en 2D

toda la información existente en 3D, por lo que según el teorema de Radon (Radon, 1917), con la adecuada combinación de estas proyecciones se puede reconstruir la estructura original.

7.4. Análisis de las micrografías y generación del modelo del espécimen

Para conseguir extraer información de estas imágenes es necesario promediar miles de ellas, ya sea en 2D o en 3D, con el fin de aumentar la relación señal/ruido. Antes es necesario clasificar y alinear las imágenes que correspondan a la misma vista de la macromolécula, para lo que existen una gran cantidad de procedimientos (Frank, 2006; Llorca, 2005) (**Fig. In18**). A veces la obtención de unas buenas medias 2D es suficiente para conseguir la información que necesitamos, pero lo más frecuente es que la meta final sea la determinación de la estructura 3D. Como se ha mencionado anteriormente, si combinamos correctamente las proyecciones 2D (ya sean partículas individuales o medias de partículas), determinando su relación angular (ángulos de Euler), podremos resolver la estructura del objeto. El promediado de imágenes conlleva dos requisitos básicos. En primer lugar, las imágenes que se promedian han de corresponder al mismo tipo de proyección del espécimen. En segundo lugar, las imágenes a promediar han de tener la misma alineación. La obtención de imágenes medias requiere por tanto clasificar el conjunto inicial de partículas y alinear después las partículas presentes dentro de cada clase. La asignación angular puede conseguirse empleando varios métodos, cuya elección dependerá del comportamiento de la muestra y de la estrategia de procesamiento que se decida seguir (Frank, 2006). El método utilizado en esta Tesis es el alineamiento multireferencia respecto a imágenes de proyección de una estructura conocida (Harauz & Ottensmeyer, 1984; van Heel, 1984) (**Fig. In19**). A partir de

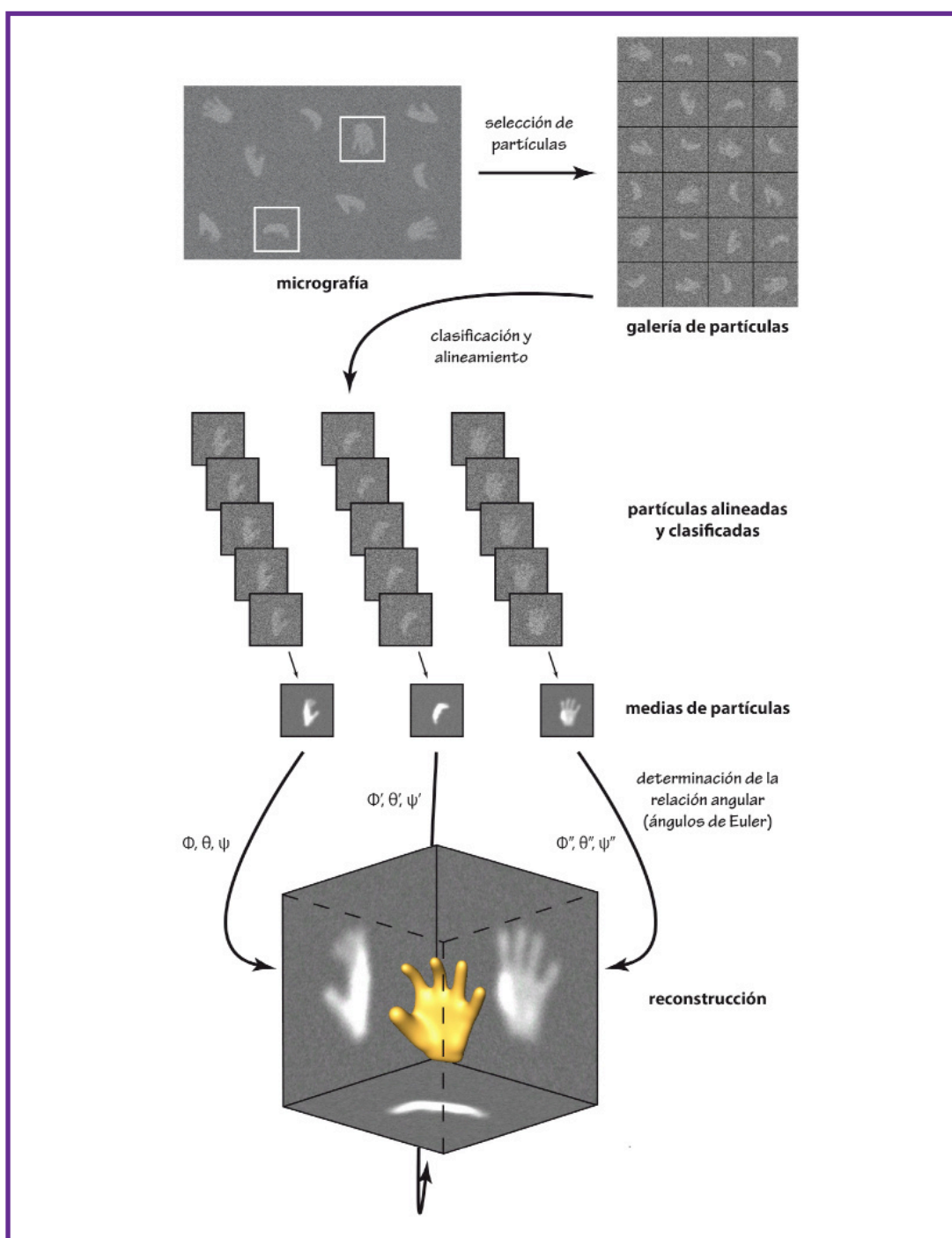


Figura In18. Esquema del procesamiento de imágenes. Se ha empleado un mapa artificial de una mano para ilustrar el proceso. Primero se obtienen las micrografías electrónicas en las que pueden observarse distintas proyecciones ruidosas del objeto, correspondientes a las orientaciones que éste adopta sobre el soporte de microscopía (rejilla). Tras seleccionar miles de partículas, se procede a su clasificación y alineamiento en grupos que correspondan a la misma orientación. Determinando la relación angular de las partículas de cada grupo o a sus correspondientes medias, se pueden combinar en tres dimensiones para reconstruir el objeto estudiado (Adaptado de Arias-Palomo, 2008).

un volumen de referencia determinado se generan imágenes de proyección con ángulos de Euler conocidos. El volumen se proyecta en múltiples direcciones y se obtienen imágenes de proyección que representan adecuadamente la diversidad de posibles orientaciones. A continuación, el conjunto de imágenes de las partículas individuales se compara con las imágenes de proyección generadas. A cada imagen se le asigna por tanto los ángulos de Euler de la imagen de proyección con la que presentan un mayor parecido. Por último, se genera una nueva estructura utilizando las imágenes de las partículas individuales con los ángulos de Euler asignados. También es posible que las imágenes asignadas a la misma clase o referencia se promedien para obtener una imagen media. En ese caso, las imágenes medias de las diferentes clases serán las que se utilicen en la obtención del nuevo volumen. Este volumen será una representación más fiel de la estructura tridimensional del espécimen ya que se construye utilizando las imágenes de las partículas individuales obtenidas experimentalmente. A continuación, se lleva

a cabo un proceso de refinamiento angular que permita mejorar de manera iterativa la asignación de los ángulos de Euler. El volumen que se obtiene tras cada iteración se utiliza en la siguiente iteración como volumen referencia. El procesamiento evoluciona y los volúmenes generados son cada vez más coherentes con las imágenes experimentales. El proceso de clasificación y alineamiento será más preciso tras cada iteración puesto que las referencias utilizadas representan más fielmente la estructura tridimensional del espécimen. El proceso termina estabilizándose cuando las variaciones en la asignación de las partículas a las diferentes clases son mínimas.

Existen diversos paquetes informáticos para realizar el procesamiento digital de partículas individuales. Algunos de los más empleados son EMAN (Ludtke et al, 1999), SPIDER (Frank et al, 1996), XMIPP (Marabini et al, 1996; Sorzano et al, 2004) y Bsoft (Heymann, 2001). Es frecuente que durante el procesamiento digital de imágenes individuales se combinen programas presentes en distintos paquetes informáticos.

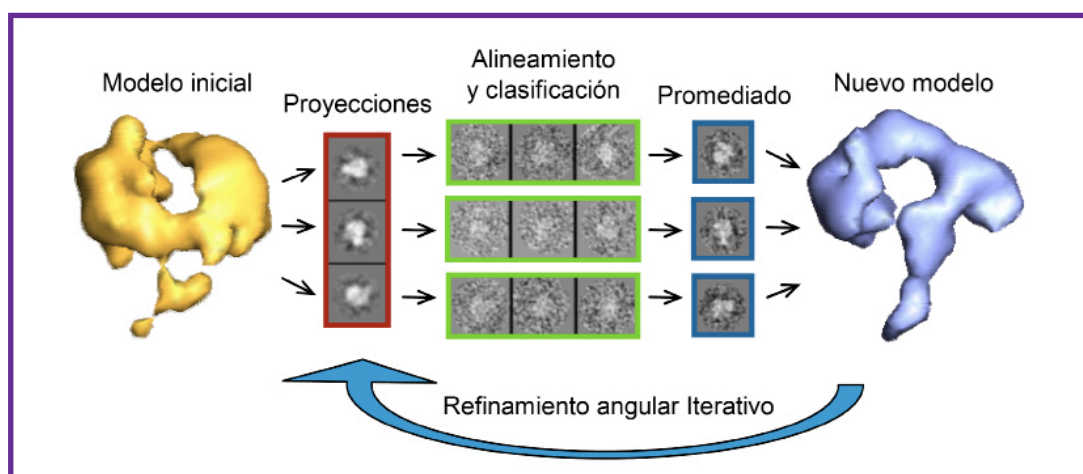
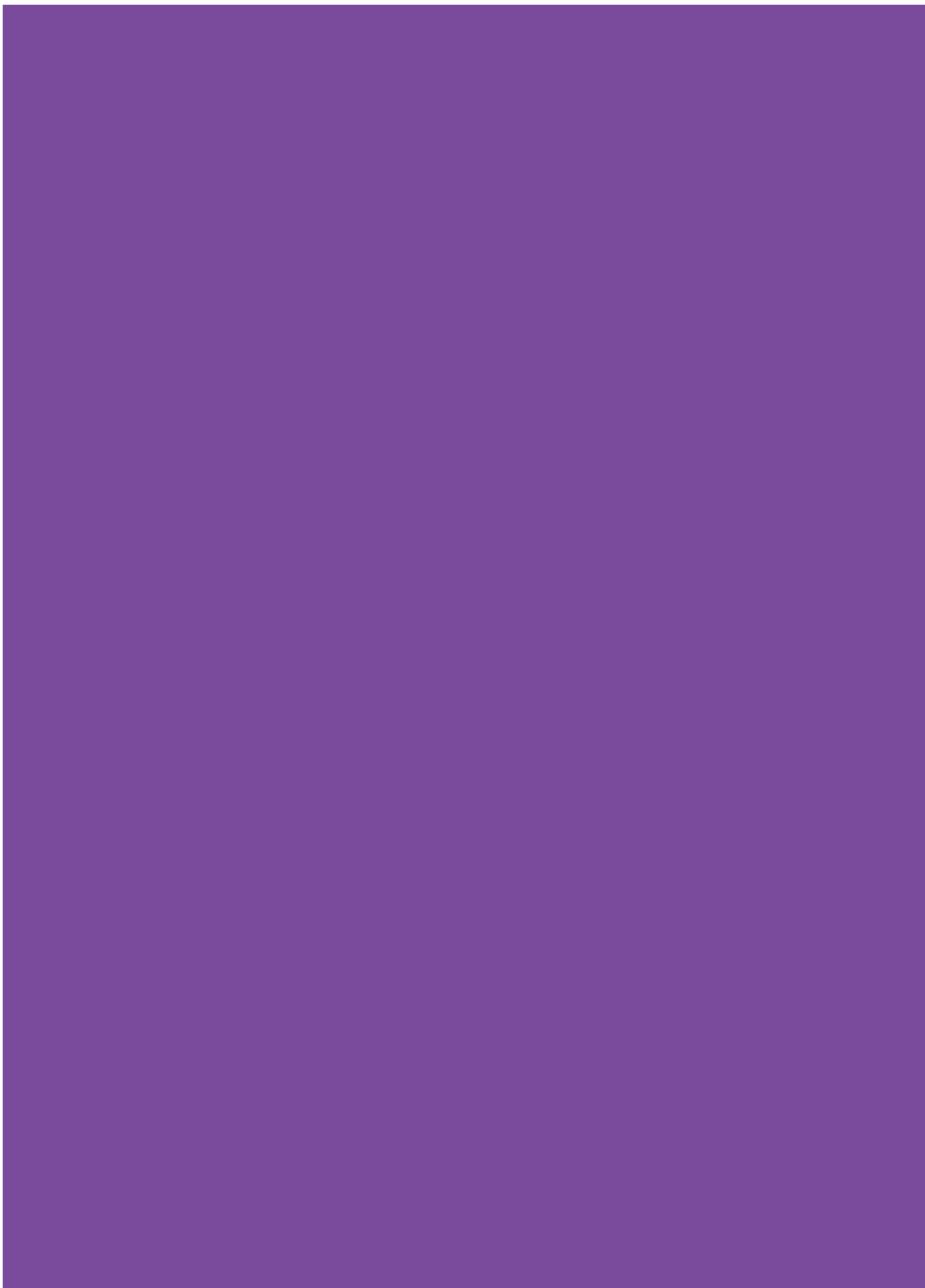


Figura In19. Esquema general del proceso de refinamiento angular. Primero el volumen referencia se proyecta en diferentes orientaciones. Las proyecciones se utilizan como referencias para clasificar el conjunto inicial de partículas individuales. A continuación, las imágenes dentro de cada clase se alinean y promedian de forma iterativa. Se obtiene por tanto una nueva imagen media para cada clase cuyos ángulos de Euler se conocen. Las nuevas imágenes medias se utilizan para construir un nuevo volumen que servirá como volumen referencia en la siguiente iteración. El refinamiento angular iterativo termina estabilizándose generando la estructura final (Adaptado de Rivera-Calzada, 2008).

7.5. Cálculo de la resolución

Una vez concluido el proceso de refinamiento angular iterativo, se lleva a cabo la estimación de la resolución para la estructura resuelta. El objetivo de esta estimación consiste en definir de manera cuantitativa el grado de detalle que se aprecia en el volumen obtenido. Para ello, el conjunto inicial de imágenes se divide en dos grupos y se calcula la estructura correspondiente para cada grupo. Después las dos estructuras se comparan en el espacio de Fourier y se calcula la correlación entre ambas en función de la frecuencia espacial o FSC (del inglés “Fourier shell correlation”). A partir de la frecuencia espacial se calcula la resolución. Por último, el volumen resuelto se filtra a la resolución estimada de manera que se eliminan las frecuencias espaciales accesorias y se obtiene la estructura final.



OBJETIVOS

It's life, Jim, but not
as we know it!

Dr. McCoy

La transcripción y la replicación del genoma del virus de la gripe son llevados a cabo por el complejo de la polimerasa viral en el núcleo de la célula infectada. Aunque se han estudiado extensivamente estos procesos y se ha avanzado en el conocimiento de los mecanismos implicados, sus detalles moleculares no están bien establecidos, esencialmente por la falta de información estructural. Además, todavía no se conoce exhaustivamente cómo son transportados cada uno de los componentes de las RNPs al núcleo después de haber sido traducidos en el citoplasma.

Por ello, los objetivos planteados en esta Tesis han sido:

1. Determinación de la estructura tridimensional de un complejo mínimo de replicación constituido por la polimerasa viral soluble asociada a un RNA viral, mediante microscopía electrónica, y su análisis funcional.
2. Análisis estructural y funcional de la unión a *cap* de la subunidad PB2 de la polimerasa.
3. Análisis de las implicaciones de la señal de localización nuclear (NLS) de la subunidad PB2 en la funcionalidad de la polimerasa del virus de la gripe.



MATERIALES Y MÉTODOS

Absence of evidence is
not evidence of absence.

Materiales

1. Líneas celulares eucariotas

HEK-293T: células embrionarias de riñón humano (DuBridge et al, 1987) cedidas por J.C. de la Torre.

HeLa: células de carcinoma humano obtenidas de la ATCC.

Ambas líneas se cultivaron como se ha descrito previamente (Ortín et al, 1980).

2. Bacterias

La cepa bacteriana utilizada para la amplificación de todos los plásmidos fue *E. coli* DH5 α .

3. Virus

El virus *Vaccinia* recombinante vTF7-3, que expresa la polimerasa del fago T7 (Fuerst et al, 1987), fue cedido por B. Moss.

4. Plásmidos

pGPB1TAP: codifica la subunidad PB1 fusionada a la etiqueta TAP (*tandem-affinity-purification*) en el extremo C-terminal bajo el promotor de la polimerasa del fago T7 (Jorba et al, 2008b).

pGPA, pGNP: codifican la subunidad PA de la

polimerasa y la proteína NP, respectivamente, bajo el promotor de la polimerasa del fago T7 (Mena et al, 1994).

pCMVPB1, pCMVPB2, pCMVPA, pCMVNP: codifican las subunidades de la polimerasa y la proteína NP bajo el promotor de Citomegalovirus (Falcón et al, 2004).

pCMVPB2-His: contiene el cDNA de la subunidad PB2 con una etiqueta de seis Histidinas en el extremo C-terminal. Fue generado por R. Coloma (Guilligay et al, 2008).

pHHNSCAT: codifica la proteína CAT en polaridad negativa entre los extremos no traducidos de NS y bajo el promotor de la RNA polimerasa I. Fue construido por A. Rodríguez (Guilligay et al, 2008).

pHHclone23: codifica una secuencia tipo viral de 248 nucleótidos bajo el promotor de la RNA polimerasa I. Fue construido por R. Coloma (Guilligay et al, 2008).

5. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados fueron:

Anticuerpo	Procedencia	Dilución
PB1	Rata	1:250 IF
PB1-J/K	Conejo	1:1000 WB
PB2	Ratón	1:200 WB 1:3 IF
PA	Ratón	1:100 WB 1:100 IF
NP	Conejo	1:5000 WB 1:5000 IF

Tabla MM1. Anticuerpos utilizados. WB = Western blot; IF = Inmunofluorescencia

PB1: suero policlonal generado por inmunización de ratas con la subunidad PB1 (Tabla MM1).

PB2, PA: anticuerpos monoclonales específicos para las subunidades PB2 y PA, respectivamente, que han sido descritos previamente (Bárcena et al, 1994; Ochoa et al, 1995) (Tabla MM1).

PB1-J/K: suero policlonal generado por inmunización de conejos con el dominio C-terminal de PB1. Fue generado y cedido por N. Zamarreño (Tabla MM1).

NP: suero policlonal generado por N. Zamarreño en conejos al inmunizar con la proteína His-NP (Resa-Infante et al, 2008) (Tabla MM1).

Los anticuerpos secundarios utilizados para Western Blot (WB) se obtuvieron de Sigma y los usados para Inmunofluorescencia (IF) se obtuvieron de Invitrogen.

6. Resinas de cromatografía

La resina 7mGTP-Sepharose-4B (7mGTP-S) fue adquirida a *GE healthcare*, mientras que la resina Ni^{2+} -NTA- Agarosa (Ni^{2+} -NTA) fue adquirida a *Invitrogen*. Por otro lado, la resina IgG-Sepharose fue adquirida a *Amersham-Pharmacia* y la resina Sephacryl S-300 HR fue obtenida en *Sigma*.

Métodos

1. Construcción de plásmidos

pCPB1, pCPB2, pCPA: las ORFs de PB1, PB2 y PA se transfirieron de la serie de plásmidos pGPB1, pGPB2 y pGPA (Nieto et al, 1994) al vector pcDNA3.1 (Resa-Infante et al, 2008). Estos plásmidos no contienen las UTRs del gen viral.

pCPB2His: se generó intercambiando la región C-terminal del gen desde el plásmido pCMVPB2-His al plásmido pCPB2. Esta región se insertó entre los sitios de restricción Apal y BspEI tras amplificarse con los oligos 56_B2BspEI y 57_B2hisApa (Anexo 2) y digerirse con estas enzimas.

pCHisTEVPA: se construyó mediante la inserción de una etiqueta de seis histidinas y el sitio de corte TEV en el extremo N-terminal de PA. Para ello, entre las dianas de las enzimas de restricción KpnI y EcoRI se insertaron dos oligonucleótidos complementarios: 15_5HisT-Ec-PA y 16_3HisT-Ec-PA (Anexo 2).

pHHvRNA, pHHcRNA: para generar estos plásmidos se insertaron dos oligonucleótidos complementarios en el plásmido pHH21 (Neumann et al, 1999) digerido con la enzima de restricción BsmBI. Los oligonucleótidos usados para generar pHHvRNA fueron 09_5vRNA(A) y 10_3vRNA(T); y para generar pHHcRNA fueron 11_5cRNA(A) y 12_3cRNA(T) (Anexo 2). Estos oligonucleótidos contienen las secuencias terminales 5' y 3' del segmento de NS, una secuencia interna y los extremos cohesivos del

sitio de corte de BsmBI. Bajo el promotor de la RNA polimerasa I, ambos transcriben una secuencia de RNA de 46 nucleótidos.

pCPB1D445E: se generó por mutagénesis dirigida sobre el plásmido pCPB1 con el kit comercial *Quickchange* de *Stratagene*. Los oligonucleótidos específicos usados fueron 81_D445Ef y 82_D445Er (**Anexo 2**).

pCPB2_737, pCPB2_738, pCPB2_KNRQ, pCPB2_8/K: se generaron por mutagénesis dirigida con el kit comercial *Quickchange* de *Stratagene* sobre el plásmido pCPB2, excepto pCPB2_8/K que se generó sobre el plásmido pCPB2_738. Las parejas de oligonucleótidos usados respectivamente fueron: 91_R737Qf y 92_R737Qr; 93_K738Qf y 94_K738Qr; 95_K752NQf y 96_K752NQr (**Anexo 2**).

pCPB2_SV, pCPB2_737_SV, pCPB2_738_SV, pCPB2_KNRQ_SV, pCPB2_8/K_SV: esta batería de mutantes se generó sobre el plásmido correspondiente de la serie anterior mediante la inserción de dos oligonucleótidos complementarios en el extremo C-terminal de cada plásmido entre las dianas de EcoRI y XbaI. Estos oligonucleótidos codifican la NLS del antígeno T de SV40. Las parejas de oligonucleótidos usados fueron 24_sv40-wt y 25_sv40-wt-c para pCPB2_SV, pCPB2_737_SV y pCPB2_738_SV, mientras que para pCPB2_KNRQ_SV y pCPB2_8/K_SV se usaron 26_sv40-mut y 27_sv40-mut-c (**Anexo 2**).

pCPB2ΔNLS, pCPB2ΔNLS_SV: para la construcción de estos mutantes se digirió el vector pCPB2 con las enzimas de restricción de BsmBI y XbaI, insertándose dos oligonucleótidos anillados 51_NLSPB2 y 52_NLSPB2-c; ó 53_NLSPB2.SV40 y 54_NLSPB2.SV40-c (**Anexo 2**), respectivamente.

pCMV_PB2_F323A, pCMV_PB2_F325A,

pCMV_PB2_H357A, pCMV_PB2_H357W, pCMV_PB2_H361A, pCMV_PB2_K376A, pCMV_PB2_F404A, pCMV_PB2_ΔVQ: se generaron por mutagénesis dirigida con el kit comercial *Quickchange* de *Stratagene* sobre el plásmido pCMVPB2-His. Las parejas de oligonucleótidos usados respectivamente fueron: 32_F323Af y 33_F323Ar; 34_F325Af y 35_F325Ar; 43_H357Af y 44_H357Ar; 49_H357Wf2 y 46_H357Wr; 30_E361Af y 31_E361Ar; 50_K376Af2 y 48_K376Ar; 41_F404Af y 42_F404Ar; 39_VQf y 37_VQr (**Anexo 2**).

2. Transfección de cultivos celulares

2.1. Fosfato cálcico

La transfección con fosfato cálcico se realizó en cultivos subconfluentes de células HEK-293T según el protocolo descrito (Wigler et al, 1979). Se describe brevemente a continuación. El medio debe cambiarse 4 horas antes de iniciar la transfección. Para la transfección de 10^7 células se mezclaron 10-20 μg de DNA en 500 μl de CaCl_2 . La mezcla se añadió gota a gota sobre 500 μl de HBS y se incubó durante 1 minuto. Acto seguido, se añadió sobre el cultivo celular también gota a gota y se incubó a 37°C durante 24-72 horas. Si la finalidad del experimento era realizar una inmunofluorescencia, se cultivaron las células sobre cubreobjetos previamente tratados con polilisina (Sigma) a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 30 minutos a 37°C .

En los experimentos de purificación de polimerasa se transfectaron 3 μg pCPB1, 3 μg pCPB2-His y 1,5 μg pCPA por cada 10^7 células. En algunos de estos experimentos además se co-transfectaban 12 μg de pHhvRNA o pHhcRNA. En algunos experimentos de comprobación de formación de complejo de polimerasa, se transfectó la combinación de plásmidos pCPB1,

pCPB2 (o el respectivo mutante) y pCHisTEVPA. Tras incubarse durante 72 h a 32°C, las células se recogieron en PBS frío, se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm, se volvieron a lavar con PBS y se guardó el *pellet* de células a -80°C hasta su posterior análisis.

2.2. Infección con vTF7-3 y transfección con fosfato cálcico

Para la expresión de plásmidos que contenían genes bajo el promotor de la polimerasa T7 se llevó a cabo una infección con el virus vTF7-3 y una posterior transfección. Los cultivos celulares se infectaron con el virus a una multiplicidad de 10 UFP (unidades formadoras de placa) por célula. Tras la adsorción del virus durante 1 hora a 37°C, se cotransfectaron las células con una mezcla de los plásmidos con fosfato cálcico. El medio de cultivo se suplementó desde el momento de la transfección con arabinósido de citosina (AraC) a 50 µg/ml para inhibir la replicación del virus. Las células se recogieron en PBS frío, se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm a 4°C y se lavaron de nuevo con PBS.

2.3. Fugene HD

Para los ensayos de inmunofluorescencia en células HeLa, éstas se transfectaron con el plásmido pCPB2 o los respectivos mutantes usando el reactivo FugeneHD (GE Healthcare) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se cambió el medio a las células 4 horas antes de iniciar la transfección. Después se mezclaron vigorosamente 1 µg de DNA con 4 µl de Fugene HD y la mezcla se dejó incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Acto seguido, se añadió la mezcla de transfección sobre el medio gota a gota, se movió suavemente y se dejó 20 horas a 37°C.

3. Reconstitución de RNPs *in vivo*

La determinación de la actividad biológica de las RNPs (transcripción más replicación), se hizo usando como medida indirecta la acumulación de proteína Cloranfenicol acetil transferasa (CAT) en la célula. Para ello, 10⁷ células HEK-293T se transfectaron mediante fosfato cálcico con 12 µg de pCMVNP, 12 µg de pHNSCAT y con los plásmidos que codifican la polimerasa incluyendo PB2 silvestre o los respectivos mutantes (3 µg del plásmido que codifica PB1, 3 µg del de PB2 y 1,2 µg del de PA). Los cultivos celulares se incubaron 20 horas a 37°C.

Para el análisis de replicación de RNPs *in vivo* de los mutantes en la NLS de PB2, 10⁷ células HEK-293T se transfectaron con 3 µg pGPB1TAP, 3 µg pCPB2 (silvestre o mutante), 0,6 µg pGPA, 12 µg pGNP y 12 µg pHclone23 mediante infección con *Vaccinia* recombinante y transfección con fosfato cálcico. Los cultivos celulares se incubaron 24 horas a 37°C.

Para el análisis de replicación *in vivo* de RNPs mutantes en el sitio de unión a *cap* de PB2, 10⁷ células HEK-293T se transfectaron mediante fosfato cálcico con 3 µg pCMVPB1, 3 µg pCMVPB2-His (silvestre o mutante), 0,6 µg pCMVPA, 12 µg pCMVNP y 12 µg pHclone23. Los cultivos celulares se incubaron 20 horas a 37°C.

4. Purificación de polimerasa recombinante

4.2. Obtención de extractos celulares

Las células transfectadas se resuspendieron en tampón E (50 mM Tris.HCl, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,2% Igepal, 1 mM DTT, 1 mM

inhibidores de proteasas -Inhibitor Cocktail Incomplete, Roche-, pH 7.5). Después de dos horas de incubación a 0°C con *vortex* ocasional, el extracto se centrifugó 30 minutos a 12.000 rpm y 4°C.

4.2. Purificación por cromatografía de afinidad a 7mGTP-Sepharose-4B

El sobrenadante de la extracción celular se incubó con resina 7mGTP-S, a razón de 60 µl de cama de resina para el extracto de 10^7 células, durante 2 horas a 4°C con agitación suave en tampón E suplementado con 1 µM 7mGTP. La resina se lavó con 60 volúmenes del tampón E y seguidamente el material unido se eluyó con tampón E sin EDTA y con 140 µM 7mGTP.

4.3. Purificación por cromatografía de afinidad a Ni²⁺-NTA- Agarosa

Para esta cromatografía de afinidad se usó polimerasa con la subunidad PB2 o PA fusionada a una cola de histidinas. El sobrenadante de la extracción celular se diluyó 10 veces en el tampón N1 (50 mM Tris.HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,5% Igepal, 20 mM Imidazol, 10 mM β-Mercaptoetanol, 40 u/ml de HPRI -*Human Placental Ribonuclease Inhibitor*, de Amersham-, 1 mM inhibidores de proteasas -Inhibitor Cocktail Incomplete, Roche-, pH 8.0). Seguidamente, se incubó con la resina de Ni²⁺-NTA durante 12-14 horas a 4°C en agitación suave, a razón de 30 µl de cama de resina para el extracto de 10^7 células. La resina se lavó 10 veces con 10 volúmenes del tampón N1 con 50 mM Imidazol. Tras el lavado, el material unido a la resina se eluyó con tampón N2 (20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,5% Igepal, 200 mM Imidazol, 10 mM β-Mercaptoetanol, pH 8.0).

4.4. Purificación por doble cromatografía de afinidad a 7mGTP-Sepharose-4B y Ni²⁺-NTA- Agarosa

Para la doble cromatografía de afinidad 7mGTP-S/Ni²⁺-NTA se usó polimerasa con la subunidad PB2 fusionada a una cola de histidinas. La primera cromatografía se realizó como se ha descrito anteriormente. Para la segunda, la proteína eluida se diluyó 3 veces en el tampón N1 y se incubó con una resina de Ni²⁺-NTA durante 14 horas a 4°C con agitación suave, a razón de 50 µl de cama de resina para el material purificado del extracto de $1,2 \cdot 10^8$ células. Seguidamente, la resina se lavó con 100 volúmenes del mismo tampón y el material unido se eluyó con tampón N2.

4.5. Purificación por cromatografía de exclusión molecular

Las fracciones de polimerasa purificada por cromatografía de afinidad se filtraron en una columna de filtración molecular Sephacryl S-300 (Sigma) de 3 ml, equilibrada en tampón F (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,5% Igepal, 5 mM β-Mercaptoetanol, pH 8.0). Esta columna se calibró previamente con tiroglobulina (670 kDa), ferritina (440 kDa) y catalasa (220 kDa).

5. Purificación de RNP recombinante

5.1. Obtención de extractos celulares

Las células transfectadas con los plásmidos que codifican la RNP se resuspendieron en tampón de lisis AT (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 7,5 mM sulfato amónico, 0,025% Igepal, 1 mM inhibidores de proteasas -Inhibitor Cocktail Complete, Roche-, pH 8.0). Tras dos horas de

incubación a 0°C con *vortex* ocasional, el extracto se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Finalmente, se recogió el sobrenadante y se procesó según cada caso.

5.2. Purificación por cromatografía de afinidad a Ni²⁺-NTA- Agarosa

Los extractos citoplasmáticos se diluyeron en el tampón de unión a níquel N1 y se procedió de la misma manera que la cromatografía de afinidad a Ni²⁺-NTA para la polimerasa.

5.3. Purificación por cromatografía de afinidad TAP

Los extractos celulares se llevaron hasta una concentración final de 150 mM NaCl y 0,5% Igepal y se diluyeron 10 veces con el tampón IPP150 (10 mM Tris.HCl, 150 mM NaCl, 0,5% Igepal, pH 8.0). Se incubaron durante 16-24 horas a 4°C con resina IgG-Sepharose. Se usaron 50 µl de cama para el extracto de 3·10⁷ células. Se lavó la resina con 50 volúmenes de tampón IPP150 en columna con vacío muy lento. Del mismo modo, se equilibró con 25 volúmenes de tampón de corte de la proteasa TEV (10 mM Tris. HCl, 150 mM NaCl, 0,5% Igepal, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 8.0) y se incubó la resina 3 horas a temperatura ambiente con la proteasa TEV, según indicaciones del fabricante (Invitrogen).

6. Análisis de proteínas

6.1. Western Blot

Las distintas muestras fueron fraccionadas por electroforesis en geles de poliacrilamida (30:1), 0,1% SDS y posteriormente transferidas a membranas de PVDF (Inmobilon) durante 1

hora a 400 mA y 4°C. Los filtros se saturaron con 3% seroalbúmina bovina (BSA) durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubaron con anticuerpos monoclonales anti-PA o anti-PB2, o bien antisueros anti-PB1 o anti-NP, preparados en PBS, 0,1% BSA, 0,05% Tween 20. Tras lavar las membranas con 0,25% Tween 20 en PBS, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con una dilución 1/15.000 de suero de cabra anti-IgG de conejo o una dilución 1/3.000 de suero de cabra anti-IgG de ratón, dependiendo de la naturaleza del anticuerpo primario, conjugados con peroxidasa. Finalmente, las membranas se lavaron a temperatura ambiente con tampón de lavado y se revelaron por quimioluminiscencia.

6.2. Tinción de geles

La pureza de las distintas muestras se determinó por tinción de plata o con PageBlue (Fermentas). Para la tinción con plata los geles se fijaron con 25% etanol y 10% de ácido acético durante 1 hora. Posteriormente se trataron con 1% ácido nítrico durante 3 minutos y se incubaron en la solución sensibilizante durante 30 minutos (etanol 30%, 5% w/v tiosulfato sódico pentahidratado, 0,5 M acetato sódico). Después de lavar con agua, se incubaron con la solución de reacción (0,25% de nitrato de plata) durante 40 minutos. Se lavaron con agua 2 veces durante un minuto cada vez y se revelaron con 2,96% carbonato sódico y formaldehído al 37%. Tras el revelado, se paró la reacción con 10% ácido acético. En el caso de tinción con PageBlue (Fermentas), los geles se fijaron con 25% isopropanol y 10% de ácido acético durante 1 hora. Tras 3 lavados de 10 minutos con agua, se incubaron con el colorante. Para revelar las bandas se lavaron los geles con agua.

6.3. Electroforesis en gel nativo

Las muestras de proteína se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con tampón de carga (100 mM TrisHCl, 40% glicerol, 0,5% Serva Blue G). La electroforesis se realizó en geles de gradiente 5-15% poliacrilamida a 4°C a razón de 15 V/cm usando un tampón en el cátodo (100 mM Tris.Histidina, 0,002% Serva Blue G, pH 8.0) y otro tampón distinto en el ánodo (100 mM Tris.HCl, pH 8.8), según el método descrito previamente (Niepmann & Zheng, 2006). Los marcadores de peso molecular usados fueron tiroglobulina (670 kDa), ferritina (440 kDa) y catalasa (220 kDa). La localización de las proteínas en estos geles se determinó por tinción con plata o Western blot.

6.4. Determinación de proteína CAT

Para analizar la proteína CAT se utilizó el *kit* comercial de Roche y se siguieron las instrucciones del fabricante.

6.5. Inmunofluorescencia

Se prepararon cultivos de HEK-293T o HeLa sobre cristales de 10 mm de diámetro. Todo el experimento se realizó a temperatura ambiente. Las células se lavaron con PBS 20 horas post-transfección y se fijaron durante 20 minutos con formaldehído al 3,7%. La permeabilización se realizó con 0,5% Tritón-X-100 durante 5 minutos. Las células se bloquearon con PBS 1% BSA y se incubaron durante 45 minutos con los anticuerpos primarios correspondientes. Tras realizar 4 lavados con PBS, las células se incubaron durante 45 minutos en oscuridad con anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos. Finalmente, las células se lavaron con PBS y las preparaciones se montaron con ProLong (Invitrogen). La tinción del DNA de los

núcleos celulares se realizó con dos reactivos distintos: DAPI (visible con rojo lejano) o TopRo (visible con azul). Las muestras se observaron en un microscopio confocal de fluorescencia Leica SP5 (Leica Microsystems) y se analizaron con el paquete de programas LAS AF Software (Leica Microsystems).

7. Análisis del RNA

7.1. Extracción del RNA

El RNA asociado a los complejos de polimerasa se aisló con un tratamiento de proteinasa K (0,2 mg/ml) y 1% SDS durante 1 hora a 37 °C. Tras una extracción con fenol, el RNA se precipitó con etanol. Para facilitar la precipitación, previamente se añadió glucógeno (0,1 µg/µl) o RNA de levadura (0,2 µg/µl) dependiendo de su análisis posterior.

7.2. Marcaje del RNA

Los RNAs aislados se incubaron 30 minutos a 37°C con la fosfatasa alcalina de gamba (SAP, de USB) en el tampón comercial suplementado con 5mM DTT y 1U/µl HPRI. Tras extraer el RNA de nuevo con fenol y precipitarlo con etanol, se marcó el extremo 5'-OH con la polinucleótido quinasa T4 (New England BioLab) durante 1 hora a 37°C en un tampón que contenía el tampón comercial suplementado con 1 mM DTT, 1 U/µl HPRI y 20 µCi γ³²P-ATP (400 Ci/mmol). Los RNAs marcados radiactivamente se analizaron por electroforesis en un gel 15% poliacrilamida- 6M urea desnaturizante.

7.3. Hibridación dot-blot

Los RNAs aislados se desnaturizaron

durante 15 minutos a 55°C en 10X SSC, 7,5% formaldehído y se fijaron en un filtro de nylon por *UV cross-linking*. Como control negativo se fijó RNA de levadura y como controles positivos se usaron los oligos 09_5vRNA(A), 10_3vRNA(T), 11_5cRNA(A) y 12_3cRNA(T) (**Anexo 2**).

Como sondas se usaron oligonucleótidos sintéticos que contenían una región de la secuencia del molde en polaridad positiva o negativa (87_oligoE, 88_oligoF, 89_oligoG, 90_oligoH) (**Anexo 2**). Estas sondas se marcaron con $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP y T4 polinucleótido quinasa, de la misma manera que está especificado en el apartado anterior.

El filtro de nylon con las muestras fijadas se prehibridó durante una hora en agitación a 40°C en un tampón compuesto por: 6X SSC, 0,5% SDS, 5X Denhardt, formamida desionizada y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA de esperma de salmón desnaturalizado. La concentración de formamida dependió del oligonucleótido usado como sonda: 20,3% para 87_oligoE y 90_oligoH; 26,9% para 88_oligoF y 89_oligoG. A continuación, se añadieron las sondas marcadas y se incubó el filtro durante 14 horas. Posteriormente, se realizaron tres lavados a 40°C durante 30 minutos con un tampón que contenía 2X SSC y 0,5% SDS.

Se analizó el resultado exponiendo el filtro con una pantalla sensible a ^{32}P (Molecular Dynamics) y se cuantificó con *Phosphorimager*.

7.4. Transcripción *in vitro* de polimerasa recombinante

La actividad de la polimerasa purificada se analizó mediante transcripción *in vitro*. Para ello se incubó en un tampón compuesto por: 50 mM Tris.HCl (pH 7.5), 10 mM NaCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Actinomicina D, 1 U/ μl HPRI, 1 mM ATP, 1 mM CTP, 1 mM UTP,

1 μM GTP y 10 μCi $\alpha^{32}\text{P}$ -GTP (0,5 mCi/ μmol). Como iniciador de la transcripción se utilizó 100 μM ApG (Sigma) o 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mRNA de β globina humana (Gibco). La incubación se realizó durante 1 hora a 30°C.

El RNA sintetizado se precipitó con 10% ácido tricloacético (TCA) en presencia de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de RNA de levadura durante 30 minutos a 0°C. Por último, el precipitado se filtró con vacío sobre una membrana de nylon con un aparato de dot-blot. Tras sucesivos lavados de la membrana con 5% TCA y 1% pirofosfato, se expuso utilizando una pantalla sensible a ^{32}P (Molecular Dynamics) y se cuantificó con *Phosphorimager*.

Alternativamente, el producto de transcripción se extrajo con fenol, se precipitó con etanol y se analizó mediante electroforesis en geles de 15% poliacrilamida-6 M urea.

7.5. Transcripción *in vitro* de RNPs recombinantes

Para el ensayo de transcripción *in vitro* se incubaron las cantidades apropiadas de RNPs purificadas (determinadas por WB) en un tampón que contenía 50 mM Tris.HCl (pH 8.0), 2 mM MgCl_2 , 100 mM KCl, 1 mM DTT, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Actinomicina D, 1 U/ μl HPRI, 1 mM ATP, 1 mM CTP, 1 mM UTP, 10 μM GTP y 10 μCi $\alpha^{32}\text{P}$ -GTP (0,5 mCi/ μmol). Como iniciador de la transcripción se utilizó 100 μM ApG (Sigma) o 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mRNA de β globina humana (Gibco). La incubación se realizó durante 1 hora a 30°C. El RNA sintetizado se precipitó con 10% ácido tricloacético (TCA) en presencia de 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de RNA de levadura durante 30 minutos a 0°C y se analizó sobre una membrana de nylon con un aparato de dot-blot de la misma manera que se ha explicado en el apartado anterior.

8. Microscopía electrónica

Las fracciones del complejo polimerasa-RNA obtenidas tras la doble cromatografía de afinidad se aplicaron directamente sobre rejillas de cobre de 400 agujeros cubiertas con una película de carbón (Fedelco), sometidas previamente a una descarga iónica (*glow discharge*) durante 30 segundos para hacer hidrofílica su superficie y favorecer la adsorción del espécimen. Tras un periodo de adsorción de 1 minuto a temperatura ambiente, se eliminó el exceso de muestra, se lavó tres veces con agua y se tiñó con una solución de formiato de uranilo al 2% p/v durante 40 segundos. A continuación, se retiró el exceso de agente de tinción y la rejilla se dejó secar al aire.

Las rejillas teñidas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1230 estabilizado a 100 kV. Las micrografías se tomaron a una magnificación de 50.000 aumentos en condiciones de mínima dosis (aproximadamente $10 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$) y se registraron en películas Kodak SO-163. Estas fueron digitalizadas usando un escáner MINOLTA Dimage Scan Multi Pro a un tamaño de paso de $10,5 \mu\text{m}$. Este tamaño, junto a la magnificación con la que se tomaron las micrografías, determina que el tamaño del pixel fue $2,1 \text{ \AA}$.

Las imágenes de moléculas individuales del espécimen se seleccionaron y extrajeron utilizando el programa *boxer* de EMAN. Se extrajeron un total de 12.698 imágenes correspondientes a moléculas individuales del complejo RNA-polimerasa monomérico y un total de 3.401 de las formas presumiblemente dimericas (basado en la proximidad de dos moléculas monoméricas). A continuación, se determinó y corrigió la función de transferencia de contraste (CTF) de las imágenes con los programas BSOFT y CTFFIND3 (Heymann, 2001). Las imágenes se normalizaron para que los

distintos niveles de grises fueran equivalentes entre partículas de distintas micrografías y se escalaron a la mitad del tamaño original (comando *proc2d* de EMAN), obteniendo un muestreo final de $4,2 \text{ \AA}/\text{px}$. Después las imágenes se centraron y se les aplicó una máscara (comando *cenalignint* de EMAN) de manera que se restringía el área de análisis en cada partícula a la región donde se encontraba la proyección del espécimen. Por último, las partículas se filtraron utilizando un filtro de paso bajo (comando *proc2d* de EMAN) que elimina altas frecuencias correspondientes a resoluciones que no pueden alcanzarse mediante tinción negativa.

A continuación, se llevó a cabo un análisis inicial de los datos mediante algoritmos de alineamiento y clasificación libres de patrón, los cuales permiten obtener imágenes medias de las partículas utilizando exclusivamente la información de los propios datos y sin utilizar referencia alguna. Como estas medias se obtienen independientemente de cualquier conocimiento previo de la estructura tridimensional del espécimen, la comparación entre estas medias con las obtenidas del refinamiento en 3D sirve como criterio para evaluar la calidad del procesamiento. El análisis se llevó a cabo mediante el comando *refine2d.py* de EMAN (Ludtke et al, 1999), métodos 2D de máxima probabilidad implementados en el programa *ml_align2d* de XMIPP (Scheres et al, 2005) y mapas auto-organizativos (Pascual-Montano et al, 2001). El alineamiento y la comparación entre medias libres de referencia y proyecciones de la estructura de la polimerasa obtenida recientemente por criomicroscopía electrónica (Coloma et al, 2009) se realizaron utilizando comandos de EMAN y XMIPP (Marabini et al, 1996; Sorzano et al, 2004).

El refinamiento tridimensional de los datos correspondientes a complejos monoméricos se llevó a cabo usando métodos de refinamiento

angular iterativo. Para ello se generaron diversas referencias iniciales, desde modelos obtenidos por líneas comunes con el programa *startAny* de EMAN, a previas estructuras de la polimerasa publicadas (Coloma et al, 2009; Torreira et al, 2007) filtradas a menor resolución (100 Å) para eliminar lo máximo posible la influencia del modelo en el procesamiento. También se usó un volumen inicial generado artificialmente con forma de elipse de dimensiones similares a las observadas en las imágenes individuales. Los datos fueron inicialmente refinados con el programa *refine* de EMAN y el modelo obtenido fue sujeto a posteriores refinamientos usando métodos 3D de máxima probabilidad (Scheres et al, 2007).

La resolución del mapa obtenido se estimó mediante el coeficiente de correlación en el espacio de Fourier o Fourier Shell Correlation (FSC) en EMAN, fijándose un valor de corte de 0.6 que correspondía a 25 Å.

El programa utilizado en la visualización y representación de los volúmenes obtenidos mediante microscopía electrónica, así como de las diferentes estructuras atómicas, ha sido Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) (Pettersen et al, 2004).



RESULTADOS

Facts are facts,
perception is reality.

1. Análisis estructural y funcional de un complejo mínimo de replicación del virus de la gripe

Hasta la fecha no se dispone de un modelo estructural a nivel atómico de la polimerasa completa del virus de la gripe. Por otro lado, la estructura del complejo de la polimerasa libre de RNA a baja resolución se obtuvo por microscopía electrónica de muestras teñidas y procesamiento de imagen (Torreira et al, 2007). Dado que la mayor limitación de estos estudios fue la baja cantidad de muestra disponible, se desarrolló una nueva estrategia de purificación con dos pasos consecutivos de cromatografía de afinidad (**Fig. R1**).

1.1. Purificación de la RNA polimerasa recombinante del virus de la gripe por cromatografía de afinidad a un análogo de *cap*

El complejo de la polimerasa se expresó en células humanas por co-transfección de plásmidos que codifican las subunidades PA, PB1 y PB2. Se desarrolló una cromatografía no descrita previamente para el virus de la gripe, aprovechando la capacidad de la subunidad PB2 para unirse al *cap* de pre-mRNAs celulares (Blaas et al, 1982; Ulmanen et al, 1981). Así, se utilizó una resina de *Sepharose* unida al análogo de *cap* 7mGTP (7mGTP-S) para purificar el complejo (**Fig. R1**). Junto con la polimerasa, se analizó el extracto de células co-transfectadas con PA y PB1, o con PA y PB2. Como control negativo se usó resina *Sepharose*. La unión a las resinas se analizó mediante Western Blot (WB) usando anticuerpos específicos de cada subunidad (**Fig. R2**). Como control positivo, se analizó la retención de la proteína eIF4E en las resinas, dado que es

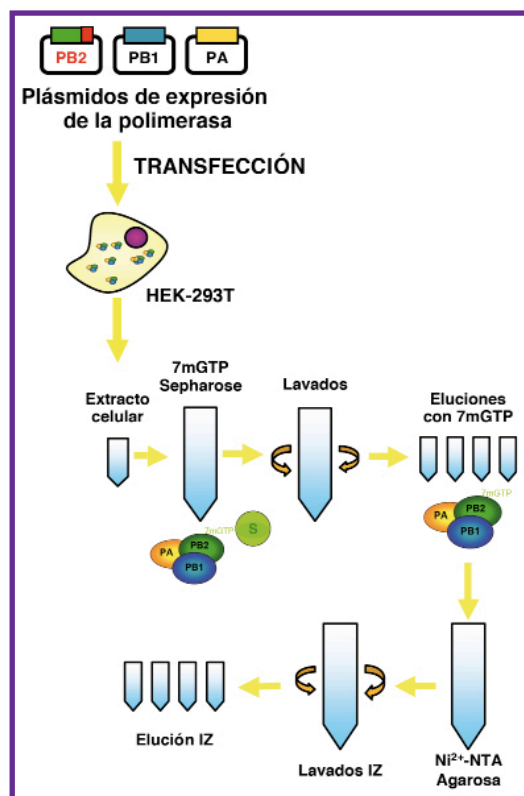


Figura R1. Esquema del proceso de purificación de la polimerasa por doble cromatografía de afinidad. Se co-transfectaron células HEK-293T con los tres plásmidos que codifican las subunidades del complejo de la polimerasa; PB2 contiene además una etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal (en rojo). El extracto celular se incubó con la resina 7mGTP-S donde el complejo de polimerasa quedó retenido específicamente vía la subunidad PB2. Tras varios lavados, se eluyó por competición con 7mGTP soluble. La proteína eluida se incubó con una resina de Ni²⁺-NTA donde el complejo de polimerasa quedó retenido por la etiqueta de histidinas de PB2. De esta resina se eluyó aumentando la concentración de imidazol en el tampón a 200 mM.

la principal proteína citoplásmica que une *cap* y pertenece al complejo eIF4F. La retención de la polimerasa en la columna de *cap* fue evidente, paralela a la de eIF4E, y específica, ya que no se detectó proteína en la resina control (**Fig. R2, Pol, comparar 7m y S**). Además, esta retención fue dependiente de la presencia de PB2, como cabría esperar, dado que el heterodímero PB1-PA no se unió a 7mGTP-S (**Fig. R2, PB1+PA**). Cuando las subunidades PB2 y PA se co-expresaron, PB2 también se unió a 7mGTP-S, aunque en menor

grado. Sin embargo, PA no se quedó retenida porque la interacción PB2-PA es débil (Hemerka et al, 2009) (**Fig. R2, PB2+PA**).

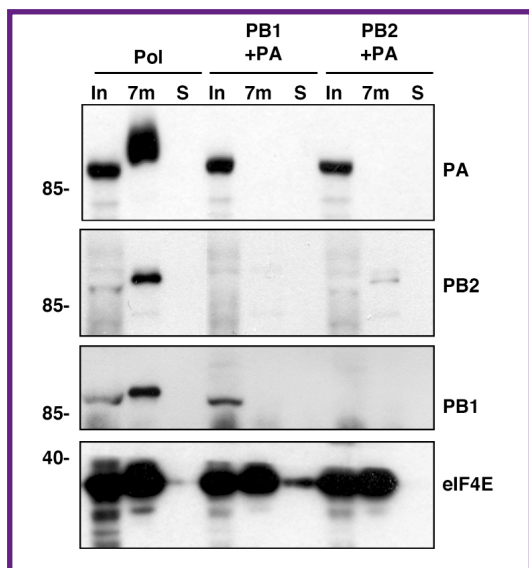


Figura R2. Unión de la polimerasa a la resina 7mGTP-S. Varias combinaciones de las subunidades de la polimerasa se expresaron en células HEK-293T y los extractos (In) se analizaron por unión a 7mGTP-S (7m). Como control negativo se utilizó Sepharose (S). Se muestran los resultados de los WB con anticuerpos específicos de cada subunidad para el análisis del heterotrímero (Pol) o de los heterodímeros (PB1+PA; PB2+PA). eIF4E se utilizó como control positivo de la unión a *cap*. La posición de las bandas de cada proteína se indica a la derecha y la movilidad de los marcadores de peso molecular a la izquierda.

1.2. Purificación de alto rendimiento de la RNA polimerasa recombinante

Con el objetivo de conseguir un mayor rendimiento en las purificaciones de polimerasa recombinante, se transfectaron células HEK-293T con el método del fosfato cálcico, ya que era el protocolo más eficaz en células humanas que se tenía puesto a punto en el laboratorio. Tras realizar diversas optimizaciones, se concluyó que el tiempo post-transfección y la temperatura que permitían un mayor rendimiento eran 72 horas y 32°C, respectivamente.

Las condiciones de unión a la resina 7mGTP-S y elución mediante competición con 7mGTP soluble se optimizaron para maximizar la recuperación de polimerasa y disminuir la co-purificación del complejo eIF4F. Para incrementar la pureza y concentración de polimerasa tras esta primera purificación con la resina 7mGTP-S, se incluyó una segunda cromatografía de afinidad con la resina Ni²⁺-NTA-agarosa (Ni²⁺-NTA). Para ello, la subunidad PB2 se expresó fusionada a una etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal (**Fig. R1**). En la **Fig. R3A** se presenta un resumen de la purificación seguido mediante la realización de un WB anti-PA de las distintas fracciones. El material purificado contenía las tres subunidades de la polimerasa, tal y como se documenta por WB con los anticuerpos específicos de cada subunidad en la **Fig. R3B**. Además, estas subunidades fueron los principales componentes proteicos de la muestra y estaban en cantidades equimolares, como se revela en la tinción por plata de la muestra purificada (**Fig. R3C**).

1.3. Análisis del estado de agregación de la RNA polimerasa purificada

El análisis de la polimerasa purificada por cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl-S300 indicó que la mayoría de este material estaba en forma de alto peso molecular porque eluía cerca del volumen de exclusión (**Fig. R3D**). Este perfil de elución es consistente con la formación de agregados grandes de la polimerasa ($n > 3$) (Jorba et al, 2008a) (**Fig. In13**) e impidió cualquier análisis estructural ulterior.

1.4. Generación de complejos RNA polimerasa viral-vRNA

Dado que las preparaciones de polimerasa purificada descritas previamente estaban

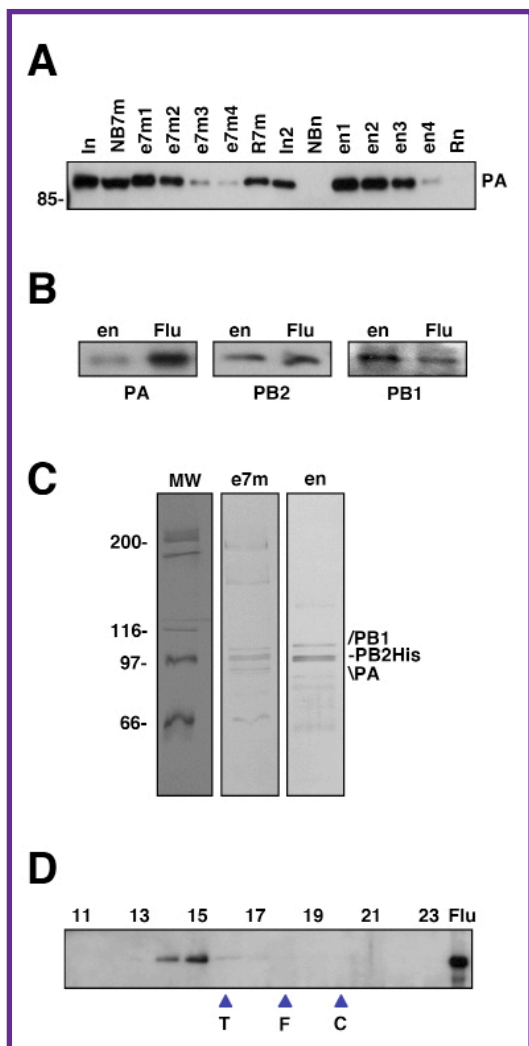


Figura R3. Purificación del heterotrímero de polimerasa.

A) Análisis del proceso de purificación por WB anti-PA. Las fracciones analizadas fueron: In: extracto celular; NB7m: no unido a 7mGTP-S; e7m1-4: eluciones de la columna 7mGTP-S; R7m: retenido en la columna 7mGTP-S; In2: material eluido que se incubó con resina de Ni^{+2} -NTA; NBn: no unido a Ni^{+2} -NTA; en1-4: eluciones de la columna Ni^{+2} -NTA; Rn: retenido en la resina de Ni^{+2} -NTA. La posición de las bandas de PA se indica a la derecha y la movilidad de los marcadores de peso molecular a la izquierda. **B)** WB de la preparación de la polimerasa purificada (en) utilizando como control los extractos de células infectadas con virus de la gripe (Flu). La especificidad de cada anticuerpo se indica en la parte inferior. **C)** La composición proteica de los dos pasos de purificación de la polimerasa (e7m: eluciones de 7mGTP-S; en: eluciones de Ni^{+2} -NTA) se muestra tras realizar una electroforesis en un gel de poliacrilamida teñido con plata. La movilidad de los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda y la posición de las bandas relevantes a la derecha. **D)** Cromatografía de exclusión molecular de la polimerasa purificada en Sephacryl-S300. Se presenta el WB anti-PA de las fracciones eluidas. Los números de la parte superior indican las fracciones de elución. La posición de la banda específica anti-PA se muestra a la derecha (Flu). La elución de los marcadores de peso molecular se indica en la parte inferior (T: tiroglobulina; F: ferritina; C: catalasa).

desprovistas esencialmente de factores celulares asociados, una posible explicación de la agregación observada podría ser que el heterotrímero libre fuera capaz de interactuar con él mismo, seguramente a través de las subunidades PB1 o PB2 (Jorba et al, 2008a). Esto contrasta con lo observado para las RNPs recombinantes purificadas, que se comportan como complejos monoméricos en la cromatografía de exclusión molecular (Coloma et al, 2009). Considerando estos hechos, podría pensarse que un complejo polimerasa-vRNA que emule el complejo de la polimerasa en la RNP, podría permanecer monomérico y ser susceptible a un análisis estructural.

Diversos grupos han generado *in vitro* complejos polimerasa-promotor (Elton et al, 2005; Neumann et al, 2004; Ortín, 2008; Torreira et al, 2007), pero la eficiencia del proceso fue muy baja en todos los casos. Por consiguiente, se intentó la generación de dichos complejos *in vivo* mediante la co-expresión de las tres subunidades de la polimerasa con un vRNA molde de 46 nucleótidos (Fig. R4A).

El proceso de doble cromatografía de afinidad descrito previamente se optimizó utilizando como referencia el ensayo de la actividad transcripcional *in vitro*, con el objetivo de purificar exclusivamente complejos polimerasa-vRNA. Un resumen del nuevo proceso de purificación se presenta en la Fig. R4B seguido mediante la realización de un WB anti-PA de las diversas fracciones. El material purificado contenía las tres subunidades de la polimerasa (Fig. R4C). Además, se analizaron las muestras purificadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción con plata, revelando que la relación entre las subunidades de la

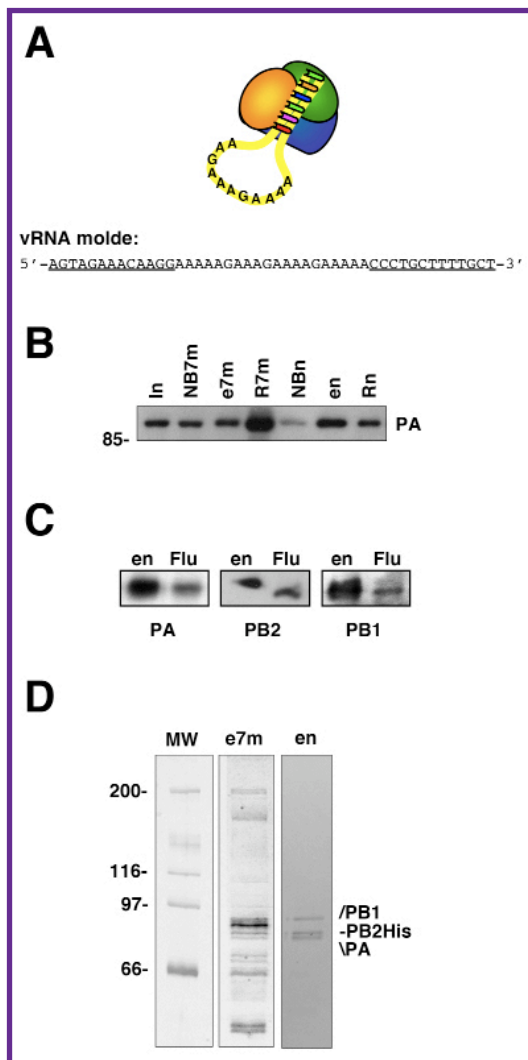


Figura R4. Purificación de los complejos polimerasa-vRNA. **A)** Diagrama del complejo polimerasa-vRNA y secuencia del vRNA molde. **B)** Análisis del proceso de purificación por WB anti-PA. Las fracciones analizadas fueron: In: extracto celular; NB7m: no unido a 7mGTP-S; e7m: eluciones de la columna 7mGTP-S; R7m: retenido en la columna 7mGTP-S; NBn: no unido a Ni^{2+} -NTA; en: eluciones de la columna Ni^{2+} -NTA; Rn: retenido en la resina de Ni^{2+} -NTA. La posición de las bandas específicas de anti-PA se indica a la derecha y la movilidad del marcador de peso molecular a la izquierda. **C)** WB de la preparación de la polimerasa purificada (en) utilizando como control los extractos de células infectadas con virus de la gripe (Flu). La especificidad de cada anticuerpo se indica en la parte inferior. **D)** La composición proteica de los dos pasos de purificación de la polimerasa (e7m: eluciones de 7mGTP-S; en: eluciones de Ni^{2+} -NTA) se muestra tras realizar una electroforesis en un gel de poliacrilamida teñido con plata. La movilidad de los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda y la posición de las bandas relevantes a la derecha.

polimerasa era prácticamente equimolar y que éstas eran las proteínas más abundantes en la muestra (**Fig. R4D**).

Con el propósito de caracterizar el RNA viral potencialmente asociado a la polimerasa purificada, se extrajo el RNA total, se defosforiló, se marcó con $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP mediante polinucleótido quinasa y el tamaño del RNA marcado se analizó por electroforesis en un gel de poliacrilamida-urea desnaturante. Como control, se analizó en paralelo el posible RNA

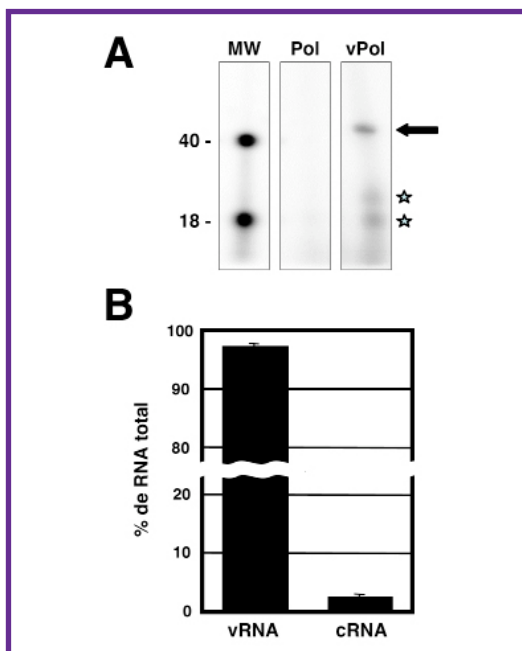


Figura R5. Análisis del RNA viral asociado a los complejos purificados de polimerasa-vRNA. **A)** El RNA de purificaciones de polimerasa (Pol) (ver Fig. R3) o polimerasa-RNA (vPol) se aisló, defosforiló, marcó terminalmente con $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP y se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturante. Se presenta la autorradiografía, así como la movilidad de oligonucleótidos de 40 y 18 nt marcados (MW). La flecha indica la banda mayoritaria de RNA y las estrellas indican dos potenciales productos de degradación. **B)** El RNA asociado a las preparaciones polimerasa-vRNA purificadas se extrajo y se analizó por hibridación dot-blot utilizando sondas específicas para cada polaridad. Como controles se incluyeron cantidades conocidas de oligonucleótidos sintéticos homólogos correspondientes al molde vRNA y a su complementario. Se presenta la media y desviación estándar de seis experimentos independientes.

asociado a la polimerasa purificada de células únicamente transfectadas con los plásmidos de expresión de la polimerasa, sin incluir el pHVrRNA. Los resultados que se presentan en la **Fig. 5A**, muestran que no se detectó RNA en la preparación control (**Fig. 5A, Pol, flecha**). Asimismo, en la preparación de polimerasa co-transfectada con el plásmido que expresa el vRNA se detectaron una banda mayoritaria del tamaño esperado (46 nt) (**Fig. 5A, vPol, flecha**) y dos bandas minoritarias de 18-20 nt que podrían ser sus productos de degradación (**Fig. 5A, vPol, estrellas**).

Para determinar la especificidad, polaridad y cantidad de este RNA asociado a la polimerasa purificada, se fijaron muestras del RNA purificado en una membrana de nylon junto a cantidades conocidas de oligonucleótidos que contenían una secuencia idéntica al vRNA modelo co-expresado intracelularmente o una secuencia complementaria (correspondientes a los oligonucleótidos 09_5vRNA(A) y 10_3vRNA(T), **Anexo 2**). Las membranas se hibridaron independientemente con dos oligonucleótidos sintéticos marcados en el extremo 5' (87_oligoE y 88_oligoF, **Anexo 2**) complementarios a las regiones 5' del molde suministrado *in vivo* y de su posible producto de replicación. Los resultados mostrados en la **Fig. 5B** se obtuvieron de seis purificaciones independientes e indican que el RNA asociado a la polimerasa es específico de virus, siendo en su mayoría de polaridad negativa, aunque una pequeña proporción es cRNA de polaridad positiva.

1.5. Análisis del estado de agregación del complejo RNA polimerasa-vRNA purificado

Para establecer el peso molecular aparente de los complejos polimerasa-vRNA purificados, éstos se analizaron por cromatografía de

exclusión molecular en Sephacryl-S300 (**Fig. R6A**). Los resultados muestran que estos complejos no estaban en forma de agregados (comparar **Fig. R3D** y **Fig. R6A**), sino que eluían como se esperaba del heterotrímero monomérico. Para estimar con mayor precisión el tamaño de los complejos polimerasa-vRNA, las muestras se analizaron por electroforesis en gel nativo y WB con anticuerpos específicos de cada subunidad. De acuerdo con los resultados presentados en **Fig. 3D**, la polimerasa libre de RNA purificada mostraba una movilidad consistente con la presencia de agregados ($n>3$, más lenta que tiroglobulina) (**Fig. R6B, Pol**). Sin embargo, la preparación polimerasa-vRNA

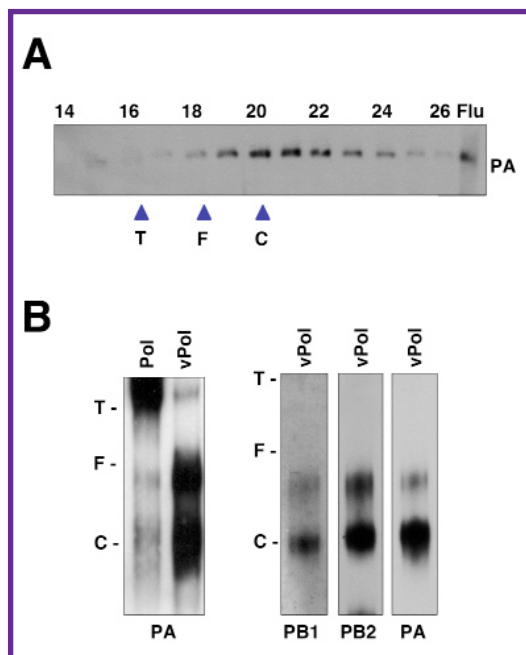


Figura R6. Análisis del estado de agregación de los complejos polimerasa-vRNA. A) Los complejos purificados se sometieron a cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl-S300. Se presenta el WB anti-PA de las fracciones eluidas. Los números de la parte superior indican las fracciones de elución. La posición de la banda específica anti-PA se muestra a la derecha (Flu). **B)** Separación por electroforesis en gel nativo de la polimerasa purificada (Pol) o complejos polimerasa-vRNA (vPol). La movilidad de la polimerasa se determinó por WB con anticuerpos para cada subunidad, especificados en la parte inferior de cada panel. Se indica la posición de los marcadores de peso molecular (T: tiroglobulina; F: ferritina; C: catalasa).

revelaba dos especies, una más rápida que migraba como el marcador catalasa y una más lenta que movía como el marcador ferritina (**Fig. R6B, vPol**). Estos resultados sugieren que las preparaciones polimerasa-vRNA contenían una mezcla de monómeros (es decir, heterotrímeros) y dímeros de polimerasa. La proporción de estas dos especies era variable entre las distintas preparaciones, pero las formas monoméricas siempre fueron más abundantes que los dímeros. La observación de que esencialmente no se detectara agregación en las preparaciones polimerasa-RNA, está de acuerdo con la idea de que la mayoría de la polimerasa presente esté asociada al molde de RNA.

1.6. Análisis estructural de los monómeros del complejo polimerasa-vRNA

La estructura de los complejos RNA polimerasa-vRNA descritos se estudió por microscopía electrónica de muestras teñidas. El análisis de campos aleatorios de las preparaciones indicó la presencia de partículas globulares con un

tamaño apropiado a la masa del heterotrímero de polimerasa (monómeros) y comparable a las imágenes publicadas de la RNA polimerasa libre de RNA (Torreira et al, 2007). También se detectaron estructuras diméricas, aunque en menor proporción, compatibles con las especies que migraban más lentas en la electroforesis en gel nativo (**Fig. R7**).

1.6.1. Análisis bidimensional de los monómeros del complejo polimerasa-vRNA

Se extrajeron de las micrografías un total de 12.698 imágenes correspondientes a las partículas monoméricas y se analizaron por diversos métodos de clasificación libre de referencia y promediado. Esta estrategia de procesamiento agrupa imágenes similares dentro de una misma clase produciendo medias 2D de subgrupos de datos homogéneos para que mejore la relación señal/ruido y las características estructurales de las imágenes sean más aparentes (**Fig. R8A**). Estas medias revelaron una proteína globular ligeramente alargada con un extremo estrecho en la

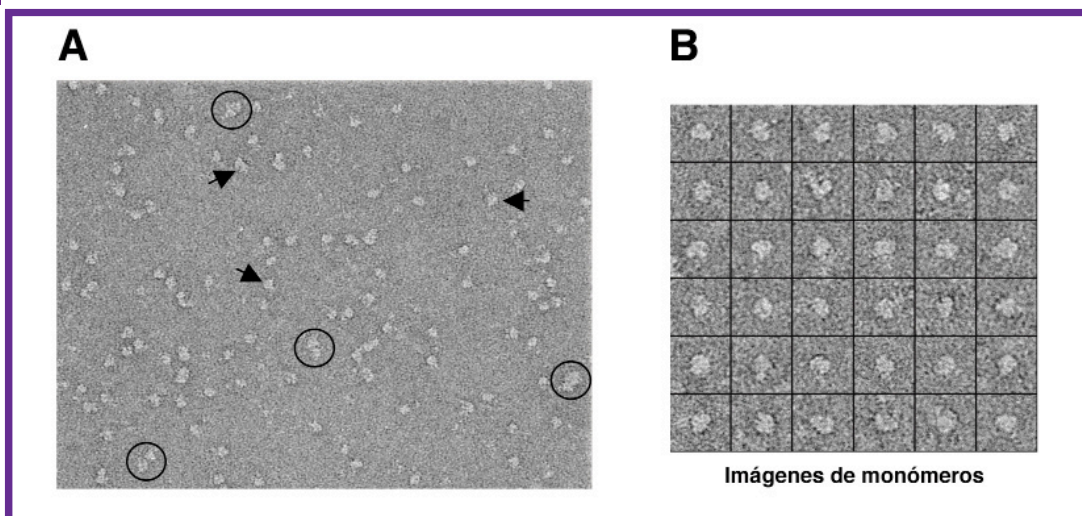


Figura R7. Análisis estructural de los monómeros del complejo polimerasa-vRNA. A) Campo seleccionado de una micrografía de ME del complejo polimerasa-vRNA. Se destacan algunos monómeros (flechas) y posibles dímeros (círculos). B) Galería de imágenes individuales de los monómeros extraídas de las micrografías.

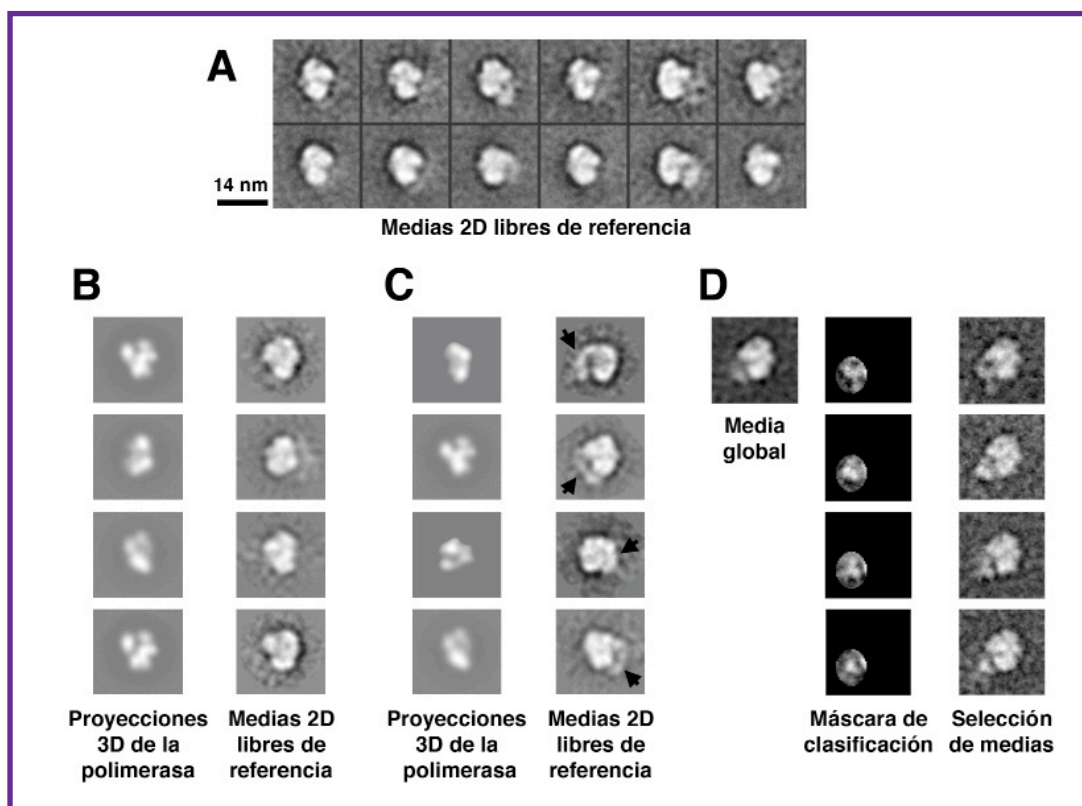


Figura R8. Análisis bidimensional de los monómeros del complejo polimerasa-vRNA. A) Galería de medias 2D libres de referencia seleccionadas del complejo polimerasa-vRNA purificado. B) Las medias 2D libres de referencia se compararon y alinearon computacionalmente con las proyecciones computacionales de la estructura publicada de la polimerasa extraída del complejo de la RNP obtenida por crio-ME (Coloma et al, 2009) y filtrada a la resolución de estos estudios. C) Tras el alineamiento con la estructura de la polimerasa extraída de la RNP, algunas de las medias 2D revelaron la presencia de una densidad extra de forma tubular que proyecta hacia el exterior de la polimerasa (flechas negras). D) Las partículas clasificadas dentro de las medias 2D libres de referencia con alguna densidad adicional que sobresalía de la estructura se volvieron a clasificar utilizando mapas auto-organizativos (sólo se muestra una media como ejemplo). Se usó una máscara para focalizar la clasificación en la densidad extra y obtener nuevas medias para cada subgrupo de imágenes.

parte inferior y uno más ancho en la superior, comparables con las medias previamente observadas para la polimerasa libre de RNA (Torreira et al, 2007). A continuación, se comparó cada una de estas medias 2D con las proyecciones computacionales de la estructura 3D obtenida por crio-ME de la polimerasa extraída de la RNP (Coloma et al, 2009) y filtrada a una resolución similar a la de estos estudios (Fig. R8B, C). Esta comparación reveló la correlación entre las dimensiones de ambas estructuras y también que las distintas vistas presentes en los datos que se estaban analizando eran altamente compatibles con vistas de la estructura previa

de la polimerasa (Area et al, 2004; Coloma et al, 2009). Sin embargo, algunas de las medias 2D del complejo polimerasa-vRNA mostraron una densidad tubular que proyectaba hacia fuera del núcleo de la polimerasa (Fig. R8C, flechas negras). Esta densidad presentaba una señal significativa por encima del ruido de fondo de las imágenes y no podría interpretarse como parte del núcleo de las subunidades de la polimerasa, dado que las medias obtenidas mostraban una molécula bien definida compatible en tamaño y forma con las proyecciones de la polimerasa obtenida por crio-ME. La explicación más probable es que esta densidad lineal podría corresponder a

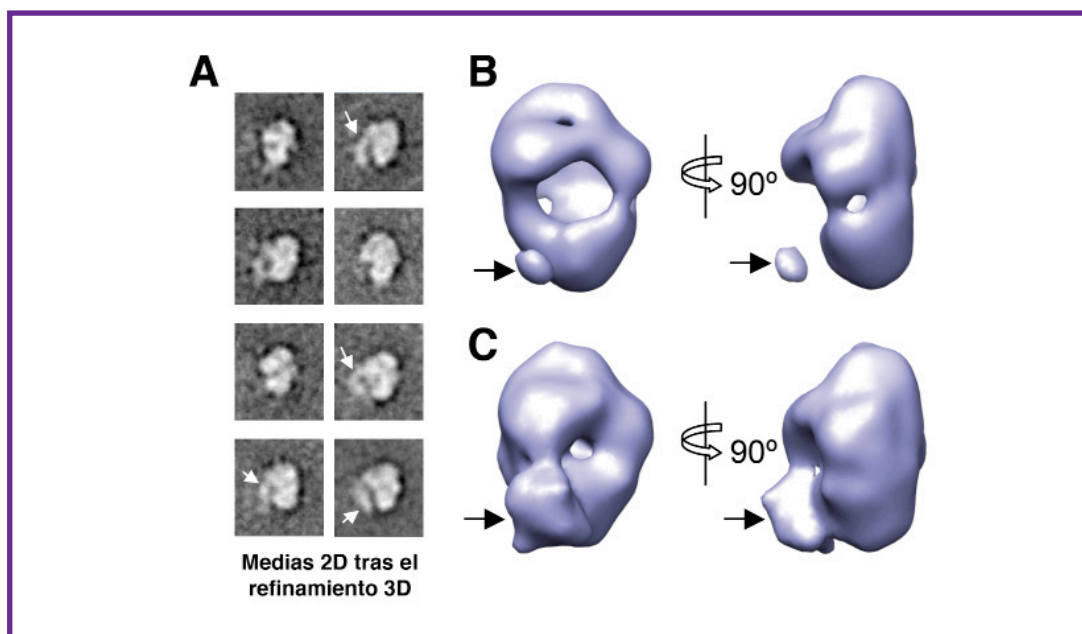


Figura R9. Reconstrucción tridimensional de los monómeros del complejo polimerasa-vRNA. A) Galería de una selección de medias 2D obtenidas tras el refinamiento angular de los datos de ME recogidos para el complejo de polimerasa-vRNA purificado. Las flechas blancas señalan la densidad extra de apariencia tubular. B y C) Vistas ortogonales de la estructura de ME de baja resolución del complejo polimerasa-vRNA. El panel superior presenta la estructura con un umbral suficiente para englobar el 100% de la proteína. El panel inferior muestra la reconstrucción 3D en un umbral que incluye las áreas circundantes de densidad por encima del ruido del fondo. Las flechas negras señalan la densidad extra de apariencia tubular.

un segmento del RNA de 46 nt presente en los complejos polimerasa-vRNA y ausente en los experimentos previos. Si los extremos de este RNA correspondientes al promotor estuvieran unidos en forma de *panhandle* y encerrados en la estructura de la polimerasa, la región central del RNA podría estar proyectando hacia fuera. La longitud observada por ME para esta densidad lineal (60-70 Å) entraría en el rango esperado para el RNA usado.

Con el objetivo de comprobar si esta densidad extra era una característica genuina del complejo polimerasa-vRNA, las imágenes de un subgrupo de datos homogéneo fueron de nuevo reclasificados mediante mapas auto-organizativos (Pascual-Montano et al, 2001). Se usó una máscara para enfocar la clasificación en la variaciones dentro del área que contenía esta densidad extra (Fig. R8D). Se obtuvieron

varias subclases en las que el material extra consistentemente salía de la misma región de la polimerasa. Sin embargo, se observaron diferencias entre las medias, que podían ser

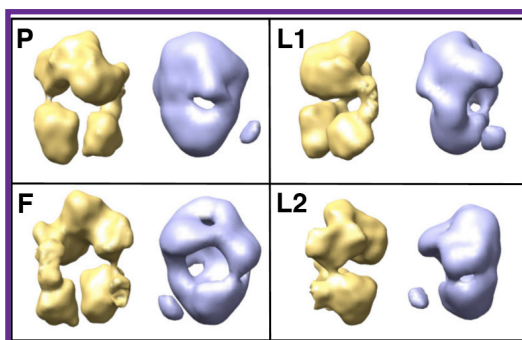


Figura R10. Comparación entre el complejo polimerasa-vRNA y la polimerasa presente en la RNP. Se presentan cuatro vistas de la estructura del complejo polimerasa-vRNA (en azul) a 25 Å de resolución en comparación con la estructura de crio-ME de la polimerasa extraída de la RNP (Coloma et al, 2009) (en amarillo). F: vista frontal; P: vista posterior; L1 y L2: vistas laterales.

consecuencia de un cierto grado de flexibilidad de esta masa que proyecta o de diferencias en la manera en que fue teñida.

1.6.2. Reconstrucción tridimensional de los monómeros del complejo polimerasa-vRNA

Las imágenes de los monómeros se sometieron a un proceso de refinamiento angular usando como volúmenes iniciales los modelos 3D descritos previamente (Coloma et al, 2009; Torreira et al, 2007) filtrados a muy baja resolución. También se usó un volumen inicial generado artificialmente con forma de elipse de dimensiones similares a las de la polimerasa. El volumen final obtenido en cualquiera de los casos fue el mismo, independientemente del modelo inicial usado, reforzando la fiabilidad de la reconstrucción final, que se resolvió a una resolución de ~ 25 Å. Las medias bidimensionales obtenidas por este refinamiento 3D (**Fig. R9A**) fueron muy similares a las medias libres de referencia obtenidas para los datos crudos (**Fig. R8A**), confirmando la consistencia de la estructura resuelta. Además, se encontró de nuevo la misma densidad saliendo de la polimerasa a pesar del uso de una estrategia diferente para el procesamiento de imagen (**Fig. R9A, flechas blancas**). Cuando se observó la reconstrucción 3D del complejo de polimerasa-vRNA a un umbral suficiente para incluir la masa esperada para la polimerasa, la molécula revelaba una región estrecha y otra más amplia en los extremos opuestos de la molécula (**Fig. R9B**). Se observó también una apertura en la vista frontal de la molécula, mientras que no había ninguna en la vista posterior. Además, cuando se modificaba ligeramente el umbral de visualización de la estructura para incluir regiones de densidad circundantes con señal por encima del ruido (**Fig. R9C**), se observó cierto material que proyectaba desde la parte frontal del complejo polimerasa-vRNA. El

extremo de esta densidad aparecía como una masa poco definida, probablemente reflejo de un cierto grado de flexibilidad del RNA presente en el complejo, lo cual concuerda con las observaciones en las medias 2D (**Fig. R8D**).

Las características estructurales del volumen 3D del complejo polimerasa-vRNA fueron claramente similares a la conformación general de la polimerasa en la RNP (Coloma et al, 2009) (**Fig. R10**), aunque la nueva estructura se haya resuelto a menor resolución. Ambas estructuras consisten en una parte posterior cerrada y una frontal abierta, lo cual contrasta con la estructura de la polimerasa libre de RNA (Torreira et al, 2007).

1.7. Análisis funcional de los complejos polimerasa-vRNA

Los complejos monoméricos polimerasa-vRNA podrían ser el resultado de una interacción directa de la polimerasa expresada en las células transfectadas con el vRNA modelo transcrito por la RNA polimerasa I o, alternatively, podrían ser el producto de una replicación *in vivo* del vRNA modelo derivado de la actividad de la polimerasa viral expresada. De la misma manera, los complejos diméricos identificados podrían ser el resultado de una agregación irrelevante *in vivo* o, alternatively, podrían representar intermedios en el proceso de replicación viral.

Para esclarecer cual de estas alternativas es la más probable, se llevaron a cabo ensayos de tratamiento con RNasa y análisis mutacional de la polimerasa, tal y como se describen a continuación.

1.7.1. Los complejos diméricos de polimerasa-vRNA son sensibles a RNasa

Los complejos polimerasa-vRNA se purificaron por doble cromatografía de afinidad como se ha descrito antes. Seguidamente, se trataron con un exceso de RNasa o se incubaron en ausencia de dicha enzima y se analizaron mediante electroforesis en gel nativo. Como se presenta en la **Fig. R11**, la mayoría, pero no todas las formas diméricas presentes en la preparación, desaparecieron tras el tratamiento con RNasa, sugiriendo que la interacción entre monómeros era dependiente de RNA para una fracción considerable de los dímeros.

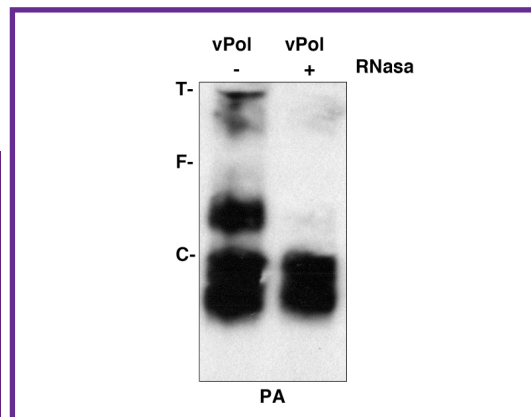


Figura R11. Los complejos diméricos polimerasa-vRNA son sensibles a RNasa. Tras la purificación de los complejos polimerasa-vRNA por doble cromatografía de afinidad, los complejos vPol se incubaron en presencia o ausencia de RNAsas y se analizaron por electroforesis en gel nativo y WB anti-PA. Se indica a la izquierda la posición de los marcadores de peso molecular (T: tiroglobulina; F: ferritina; C: catalasa).

1.7.2. La actividad de la polimerasa es necesaria para la generación de complejos polimerasa-vRNA

El papel de la actividad polimerizante para la generación de complejos polimerasa-vRNA se analizó mediante la mutación del sitio activo de la polimerasa (Biswas & Nayak, 1994). Se expresó

polimerasa silvestre o mutante que contenía la subunidad PB1 D445E, en presencia o ausencia del plásmido que codifica el vRNA molde de 46 nt. La polimerasa se purificó como se ha descrito anteriormente y las preparaciones purificadas se analizaron por electroforesis en gel nativo. Los complejos de polimerasa expresados en ausencia de molde se comportaron como se esperaba, es decir, se agregaban y migraron más despacio que el marcador de tiroglobulina, cercanos al origen del gel (**Fig. R12A, Pol, 445**). Por otro

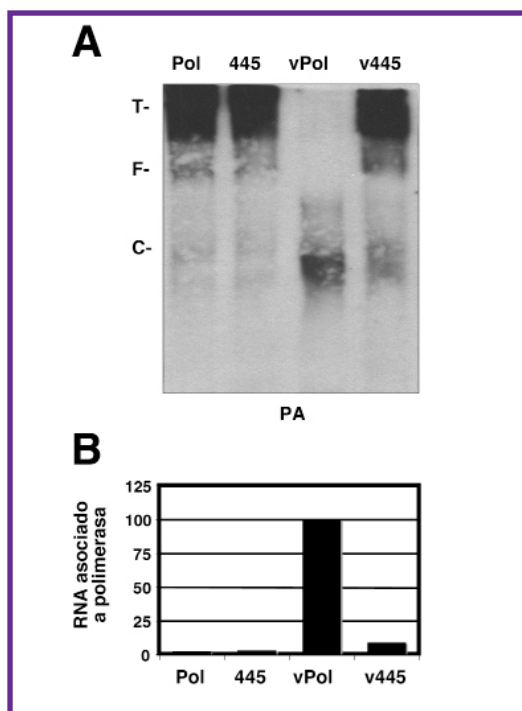


Figura R12. Requerimiento de la actividad polimerasa para la generación de complejos polimerasa-vRNA monoméricos y diméricos. Para la expresión de la polimerasa se usaron dos alelos alternativos de PB1, el silvestre o el mutante D445E (445). Además se expresó en presencia (vPol) o ausencia (Pol) de plásmido codificante de molde (pHHvRNA). **A)** Tras la purificación por doble cromatografía de afinidad, se analizaron las preparaciones por electroforesis en gel nativo y WB anti- PA. Se indica la posición de los marcadores de peso molecular (T: tiroglobulina; F: ferritina; C: catalasa). **B)** El RNA asociado a las preparaciones purificadas se extrajo y se analizó por hibridación dot-blot utilizando sondas específicas para cada polaridad. Como controles se incluyeron cantidades conocidas de oligonucleótidos sintéticos correspondiente al molde vRNA y a su complementario.

lado, los complejos de polimerasa silvestre con vRNA migraron como una mezcla de formas monoméricas y diméricas (Fig. R12A, vPol, comparar con Fig. R6B). Sorprendentemente, la mayoría del material purificado de células que expresaban la polimerasa con el mutante de PB1 D445E en combinación con el molde se comportaron como agregados, de forma similar a la polimerasa sin vRNA molde (Fig. R12A, v445, comparar con Pol o 445).

Para establecer si el material purificado de células que expresaban la polimerasa mutante PB1 D445E con el RNA molde contenía vRNA, se extrajo el RNA total presente en las preparaciones mostradas en la Fig. R12A, se aplicó sobre una membrana de nylon y se analizó mediante hibridación dot-blot (Fig. R12B). Los resultados muestran que no se detectó asociación de vRNA molde en la preparación de polimerasa mutante con vRNA molde.

Todos estos resultados indican que la actividad polimerizante de la RNA polimerasa viral es requerida para la generación de los complejos polimerasa-vRNA descritos antes y sugieren que las formas diméricas identificadas podrían representar intermedios en el proceso de replicación *in vivo*.

1.7.3. Síntesis de RNA *in vitro* por los complejos polimerasa-vRNA

Finalmente, se determinó la actividad de síntesis de RNA asociada a los complejos purificados de polimerasa-vRNA, usando dichos complejos como enzima-molde para reacciones *in vitro*, en ausencia de cualquier iniciador o en presencia de ApG o mRNA de β globina como iniciadores (Fig. R13). Los productos obtenidos sin iniciador o usando ApG mostraron la síntesis de una copia completa del molde (Fig. R13A, FL), así como una copia truncada de

aproximadamente 36 nt de longitud (Fig. R13A, Tr). Cuando se usó mRNA de β globina como iniciador, se detectó una banda mayoritaria correspondiente en longitud a la copia truncada iniciada con el oligonucleótido con *cap* (Fig. R13A, estrella). Sólo se encontró una cantidad marginal de un producto con una longitud correspondiente a la copia completa del molde con los ~13 nt primeros del mRNA (Fig. R13A, flecha). La cuantificación de las proporciones

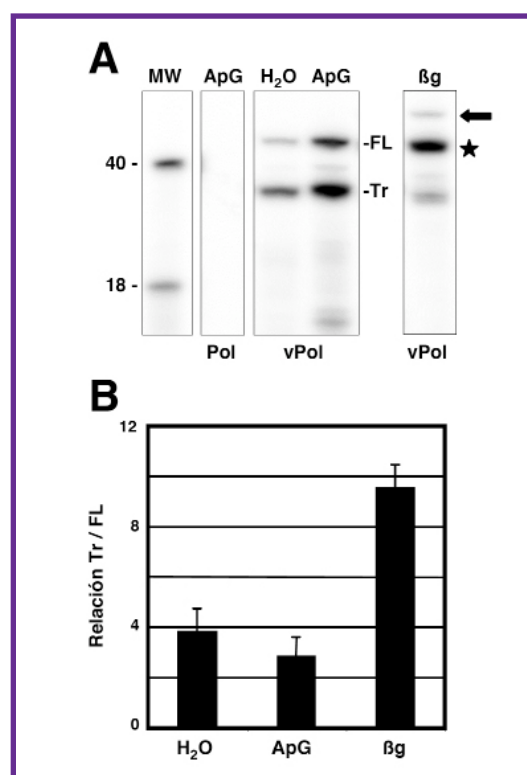


Figura R13. Síntesis de RNA *in vitro* por los complejos polimerasa-vRNA. A) Los complejos de polimerasa (Pol) o polimerasa-vRNA (vPol) se usaron para sintetizar RNA *in vitro* sin utilizar iniciador (H₂O) o añadiendo ApG (ApG) o mRNA de β globina (β g) como iniciadores. Los productos se purificaron y analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-urea y autoradiografía. Las posiciones de los productos completos (FL, "full lenght") o truncados (Tr), así como lo completos iniciados con un oligo *cap* (flecha) o con *cap* truncados (estrella) se indican a la derecha. La movilidad de los marcadores de peso molecular en nucleótidos (MW) se muestra a la izquierda. B) Cuantificación de la relación de producto truncado respecto al completo. Los resultados muestran la media y desviación estándar de tres experimentos independientes.

relativas entre los productos completos y truncados mostró que la copia completa era tres veces menos abundante cuando la reacción se iniciaba con mRNA de β globina (Fig. R13B).

1.8. Generación de complejos de RNA polimerasa viral-cRNA

Si los complejos polimerasa-vRNA descritos son realmente el resultado de la amplificación intracelular de complejos mínimos de replicación, uno esperaría que ocurriera una situación similar al expresar un molde de polaridad positiva junto con la polimerasa. Para comprobarlo, se co-expresaron las subunidades de la polimerasa con un molde cRNA de 46 nt análogo al vRNA empleado anteriormente (Fig. R14A). Los complejos de polimerasa se purificaron con el protocolo de doble cromatografía de afinidad

optimizado y el material se analizó por WB y tinción de plata tras realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida (Fig. R14B, D). Los resultados indican que se obtuvieron esencialmente complejos de polimerasa puros. Como se describió anteriormente para los complejos polimerasa-vRNA (ver Fig. R6A), el material obtenido se comportó esencialmente como monomérico en una cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl-S300 (Fig. R14C). De hecho, cuando estos complejos de polimerasa-RNA purificados se analizaron mediante electroforesis en gel nativo y WB se observó que eran principalmente monoméricos, aunque una fracción menor tenía una movilidad compatible con las estructuras diméricas (Fig. R14E, cPol). Además, cuando se prepararon complejos similares de polimerasa co-expresando PB2, PA, el plásmido pHhcrRNA y el mutante D445E de PB1, fundamentalmente

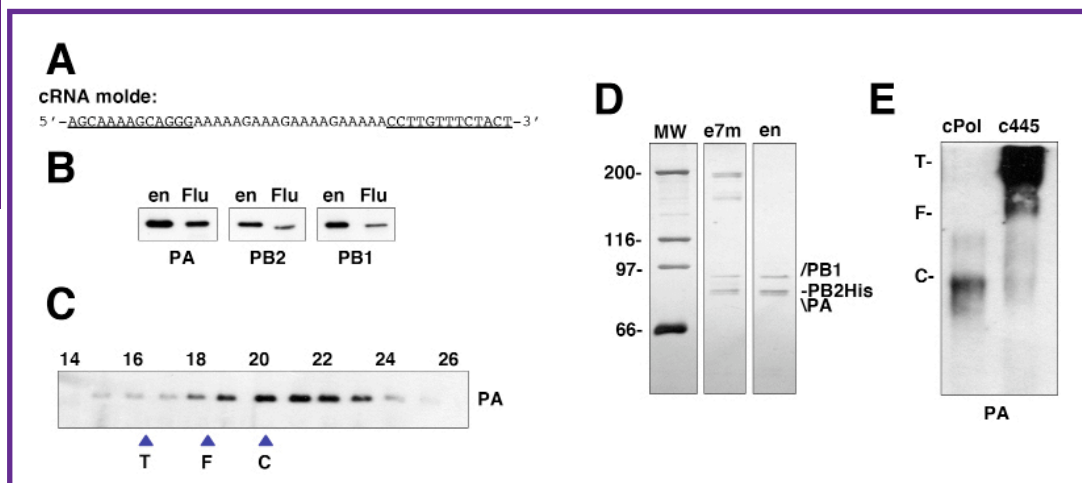


Figura R14. Purificación y caracterización de complejos polimerasa-cRNA. A) Secuencia del cRNA molde. B) Los complejos polimerasa-RNA se generaron *in vivo* por co-expresión de las subunidades de la polimerasa y un molde cRNA modelo de 46 nt. Se presenta el WB de la preparación polimerasa-RNA purificada (en) utilizando como control los extractos de células infectadas con virus de la gripe (Flu). La especificidad de cada anticuerpo se indica en la parte inferior. C) Cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl-S300. Se presenta el WB anti-PA de las fracciones eluidas. Los números de la parte superior indican las fracciones de elución. La posición de la banda específica anti-PA se muestra a la derecha. La elución de los marcadores de peso molecular se indica en la parte inferior. D) La composición proteica de los dos pasos de purificación de la polimerasa (e7m: eluciones de 7mGTP-S; en: eluciones de Ni^{2+} -NTA) se muestra tras realizar una electroforesis en un gel de poliacrilamida teñido con plata. La movilidad de los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda y la posición de las bandas relevantes a la derecha. E) La polimerasa silvestre o la mutante 445 se expresó en presencia del plásmido que genera el molde cRNA, se purificó y se analizó por electroforesis en gel nativo y WB con anticuerpos anti-PA. Se indica la posición de los marcadores de peso molecular (T: tiroglobulina; F: ferritina; C: catalasa).

no se obtuvieron complejos monoméricos o diméricos (Fig. R14E, c445). La mayor parte del material se comportaba como agregados y migraba más despacio que el marcador de tiroglobulina ($n>3$), como se observó antes con los complejos polimerasa-vRNA mutantes (ver Fig. R12A). De acuerdo con esta agregación, los niveles de RNA viral asociado a los complejos de polimerasa mutante D445E fueron mucho más bajos (Fig. R15C).

Para analizar el RNA presente en los complejos de polimerasa obtenidos, éste se extrajo, se marcó en el extremo 5' con γ - 32 P-ATP y se analizó por electroforesis en un gel de poliácridamida-urea y autorradiografía. Los resultados mostraron la presencia de una banda del tamaño esperado (46 nt; Fig. R15A, flecha), así como dos bandas adicionales compatibles con la degradación de la banda mayoritaria (Fig. R15A, estrellas). La especificidad y polaridad del RNA asociado a la polimerasa se analizó conjuntamente mediante hibridación dot-blot con sondas específicas (89_oligoG y 90_oligoH, Anexo 2). Aunque el molde proporcionado por el plásmido de transfección era de polaridad positiva (es decir, cRNA), la mayor parte del RNA asociado a la polimerasa resultó ser de polaridad negativa (vRNA) (Fig. R15B), lo cual está de acuerdo con la hipótesis de que la replicación intracelular llevada a cabo por la polimerasa viral es responsable de la generación de los complejos polimerasa-v/cRNA.

1.9. Análisis estructural de los complejos diméricos de polimerasa-vRNA

En vista de estos resultados, se analizó la estructura de las formas diméricas de la polimerasa. Como la proporción de dímeros en las preparaciones fue siempre baja, el número total de imágenes estudiado fue relativamente

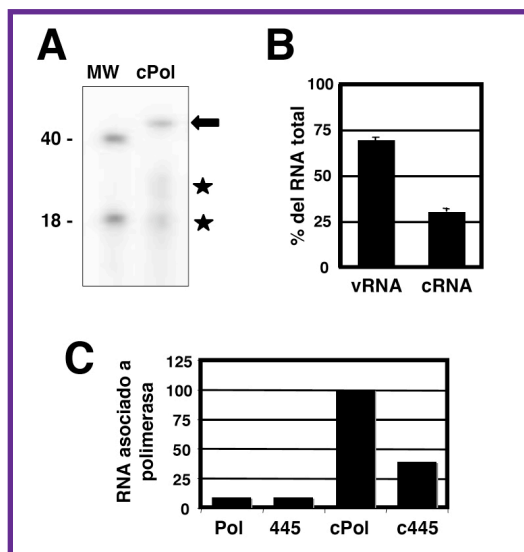


Figura R15. Caracterización del RNA asociado a los complejos polimerasa-cRNA. Los complejos polimerasa-RNA se generaron *in vivo* por co-expresión de las subunidades de la polimerasa y un molde cRNA modelo de 46 nt. **A)** El RNA presente en las purificaciones del complejo polimerasa-cRNA (cPol) (ver Fig. R14) se aisló, defosforiló, marcó terminalmente con γ - 32 P-ATP y se analizó por electroforesis en gel de poliácridamida desnaturalizante. Se presenta la autorradiografía y la movilidad de dos oligonucleótidos marcados de 40 y 18 nt (MW). La flecha indica la banda mayoritaria de RNA y las estrellas indican dos productos potenciales de degradación. **B)** El RNA asociado a las preparaciones polimerasa-RNA indicadas en (A) se analizó por hibridación dot-blot con sondas específicas para cada polaridad. Como controles se incluyeron cantidades conocidas de oligonucleótidos sintéticos homólogos correspondientes al molde cRNA y a su complementario. Se presenta la media y desviación estándar de cuatro experimentos independientes. **C)** Se usaron dos alelos alternativos de PB1, el silvestre o el mutante D445E (445) para la expresión de la polimerasa (ver Fig. R14E). Además se expresó en presencia (cPol) o ausencia (Pol) de plásmido que genera el RNA molde (pHHcRNA). El RNA asociado a las preparaciones purificadas se extrajo y se analizó por hibridación dot-blot utilizando sondas específicas para cada polaridad. Como controles se incluyeron cantidades conocidas de oligonucleótidos homólogos correspondientes al molde cRNA y a su complementario.

pequeño. En un primer paso, se clasificaron un total de 3.401 imágenes individuales de los presuntos dímeros mediante el uso de diversos algoritmos libres de referencia. Un conjunto de las imágenes reveló la asociación de dos monómeros de polimerasa de forma holgada, con una distancia inter-monomérica menor

de 50 Å. Se presentan imágenes de moléculas individuales agrupadas en esta clase en la **Fig. R16A**. Previamente se han mostrado evidencias bioquímicas que apoyan la existencia de estos complejos diméricos (**Fig. R6, 12**), una elevada proporción de los cuales son sensibles RNasa (**Fig. R11**), pero no se puede excluir que algunos de estos pares de polimerasas pudieran

representar monómeros que hayan caído cerca en las rejillas.

Sin embargo, una pequeña proporción de imágenes se clasificó como dímeros estrictos y sus imágenes medias muestran un contacto íntimo entre monómeros (ver la galería de imágenes individuales de dímeros estrictos en la **Fig. 16B** y algunas medias 2D de las mismas en la **Fig. 16C**). Algunos de estos dímeros estrictos fueron incluidos en una clase cuya imagen promedio mostraba claros detalles estructurales, distintos para cada uno de los monómeros (**Fig. R16D**). Aunque el bajo número de imágenes descartó cualquier reconstrucción tridimensional de estos dímeros estrictos, la comparación de un lado de la imagen media de los dímeros con las proyecciones del modelo del complejo monomérico de polimerasa-vRNA mostró una correlación entre cada lado del dímero y algunas de las proyecciones de la estructura 3D del monómero (**Fig. R16D**).

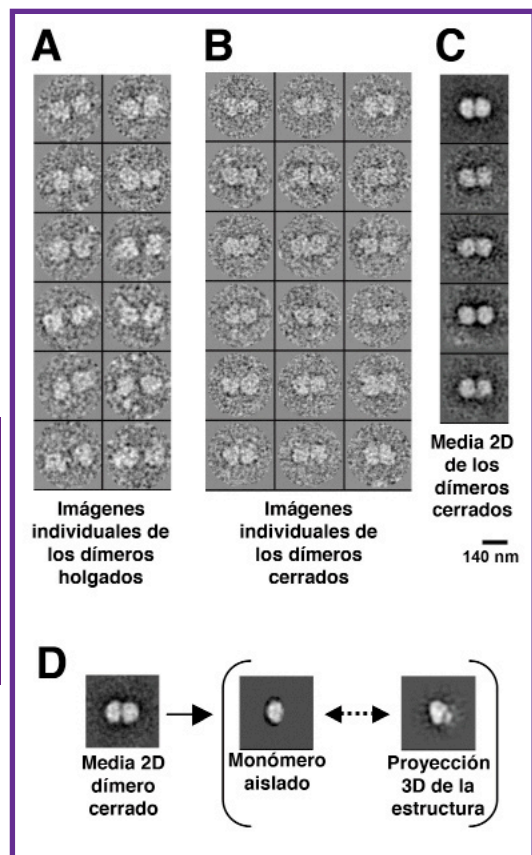


Figura R16. Análisis bidimensional de las imágenes de las estructuras diméricas de la polimerasa. **A)** Galería de imágenes individuales correspondiente a dímeros holgados. **B)** Galería de imágenes individuales correspondientes a dímeros estrictos. **C)** Ejemplos de medias 2D de dímeros estrictos obtenidas usando métodos libres de referencia. **D)** Un sub-grupo de los dímeros estrictos pudo ser alineado para generar medias con características estructurales definidas y donde los dos monómeros constituyentes fueron claramente identificados. Se extrajo uno de los monómeros de la media y se comparó con las proyecciones computacionales de la reconstrucción 3D del complejo polimerasa-vRNA, revelando una correlación con algunas vistas de ambas estructuras.

2. Análisis de las bases estructurales de la unión a cap de la subunidad PB2

A pesar de que con la nueva estrategia de purificación de polimerasa se consiguió incrementar el rendimiento y la pureza de las preparaciones, la cantidad de polimerasa obtenida no fue suficiente para poder iniciar ensayos que permitieran determinar la estructura a nivel atómico.

Hasta ahora, el complejo de la polimerasa del virus de la gripe no ha podido ser analizado mediante estudios estructurales de alta resolución, aunque se han intentado mediante abordajes muy distintos, por ejemplo sobre-expresando las subunidades del complejo en diversos sistemas celulares, tales como *E. coli*, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *S. fugiperda* o células de mamífero. Pero hasta el momento no se ha publicado que alguien haya tenido éxito en la empresa. Una de las condiciones imprescindibles para analizar una proteína por cristalografía de rayos X es la homogeneidad de la muestra. Por ello, un abordaje alternativo sería obtener la estructura de distintos fragmentos del complejo, probablemente más estables que el complejo entero, para luego unificarlos dentro del volumen tridimensional del complejo obtenido por microscopía electrónica.

2.1. Rastreo de dominios estructurales: ESPRIT

La cristalografía de proteínas es tradicionalmente una disciplina de bajo rendimiento por los cuellos de botella existentes en la expresión de proteínas y en los pasos de generación de cristales. El grupo del Dr. Hart desarrolló un sistema para aumentar la eficiencia de la cristalografía de proteínas basado en metodologías de automatización y rastreo de

alto rendimiento, permitiendo la identificación de dominios solubles de proteínas “difíciles de expresar”. Este sistema se denomina ESPRIT (*Expression of soluble proteins by random incremental truncation*) y consiste en la inserción del gen de interés en un plásmido de expresión en bacterias que contiene dos etiquetas de afinidad: en un extremo hay un péptido de unión a biotina y en el otro una etiqueta de histidinas (**Fig. R17A**). Este plásmido es linearizado por uno de los extremos del inserto y se digiere con la exonucleasa-3, generando una batería de fragmentos. Estos a su vez son digeridos por el otro extremo, de manera que se obtiene una genoteca de típicamente 30.000 plásmidos de expresión que codifican fragmentos internos aleatorios del gen de entre 150 y 250 aa. El siguiente paso es comprobar la solubilidad de los fragmentos proteicos expresados mediante el análisis de la biotinización *in vivo* en el péptido de afinidad a biotina. Así, puede ocurrir que el fragmento de la proteína sea soluble y se biotinile, o que no se pliegue bien y se degrade o sea insoluble y no pueda unirse la biotina. En el primer caso será detectable por unión a streptavina fusionada a un fluoróforo y en el segundo no será detectable (**Fig. R17B**). Este análisis se hace en colonia mediante un sistema robotizado (**Fig. R17C**). A continuación, gracias a la etiqueta de histidinas en el otro extremo del fragmento se analiza cuáles de esas construcciones biotiniladas son realmente solubles y purificables. Para ello se usa otro robot que permite hacer 96 purificaciones por cromatografía de afinidad a Ni²⁺-NTA cada vez (**Fig. R17D**). En 2007, esta técnica se usó para determinar la primera estructura atómica del fragmento soluble C-terminal de PB2 (Tarendeau et al, 2007). Habiendo determinado la estructura de este fragmento, los autores analizaron la relevancia del fragmento en el transporte de la subunidad PB2 al núcleo (**Fig. In10B**).

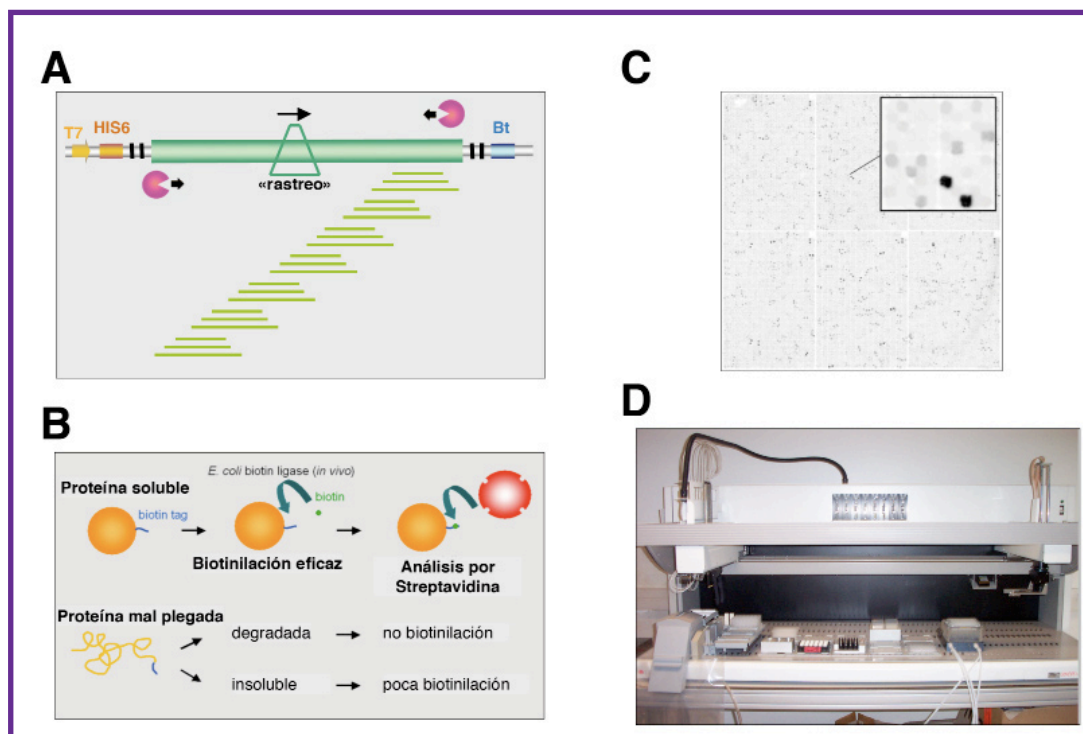


Figura R17. Rastreo de dominios estructurales: ESPRIT (Expression of soluble proteins by random incremental truncation). **A)** El gen de interés se inserta en un plásmido de expresión en bacterias (promotor T7, en amarillo) con dos etiquetas de afinidad, en un extremo hay un péptido de unión a biotina (Bt, en azul) y en el otro una etiqueta de histidinas (His6, en naranja). El plásmido se lineariza por un extremo y se digiere con la exonucleasa-3, generando una batería de fragmentos. Estos a su vez son digeridos por el otro extremo y se obtiene una genoteca (en verde). **B)** Análisis de la solubilidad de los fragmentos mediante el ensayo de la biotinilización *in vivo*. Si el fragmento de la proteína es soluble se biotinila pudiendo unirse a streptavina fusionada a un fluoróforo. Si el fragmento no se pliega bien y se degrada o es insoluble, la biotina no puede unirse eficazmente. **C)** Análisis de la expresión de proteínas solubles usando un formato de *array*. Los clones de expresión pueden distinguirse de los no expresados y aislarse para posteriores caracterizaciones. **D)** Plataforma robotizada para analizar los fragmentos solubles purificables por unión a Ni^{2+} -NTA.

2.2. Identificación del dominio de unión a *cap* de PB2

Aprovechando la estrategia de purificación de complejo de polimerasa por cromatografía de afinidad al análogo de *cap* puesta a punto en el laboratorio (Fig. R1-3) y la técnica ESPRIT, se inició una colaboración con los laboratorios del Dr. Hart y del Dr. Cusack para identificar y describir estructural y funcionalmente el sitio de unión a *cap* de PB2 que, como se ha presentado en la Introducción, ha sido muy controvertido.

El método ESPRIT permitió el análisis de dominios de plegamiento interno de PB2. Se

ensayó la expresión aproximadamente 27.000 construcciones según su estado de biotinilación. Los clones positivos que produjeron proteína soluble, es decir, que eran purificables por cromatografía de afinidad a Ni^{2+} -NTA, se reclonaron sin el péptido de biotinilación para hacer ensayos de unión a *cap* y cristalización. Tres fragmentos de PB2 (entre los aminoácidos 241-483, 268-483 y 290-483) fueron capaces de unirse específicamente a la resina 7mGTP-S. Un fragmento de degradación que abarcaba los residuos 318-483 se identificó como el dominio mínimo de unión a 7mGTP que se expresaba bien y era proteolíticamente estable.

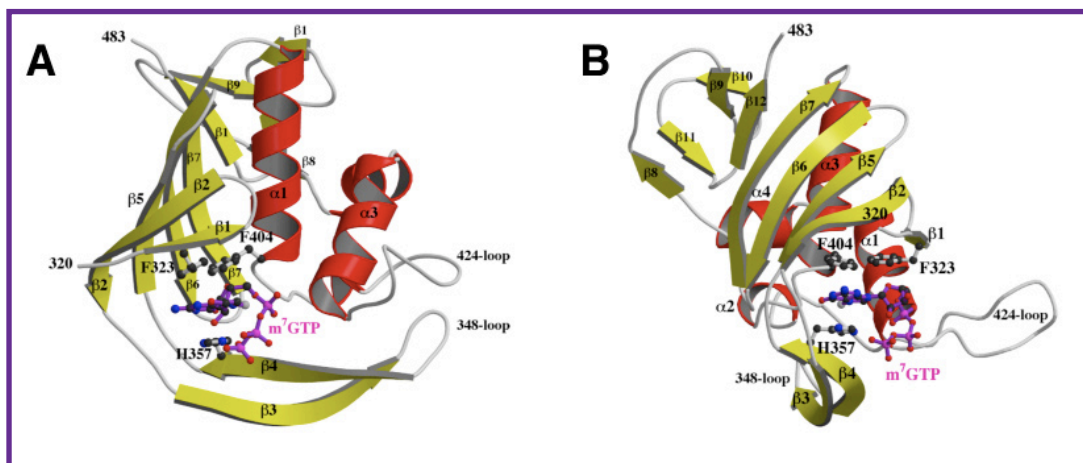


Figura R18. Estructura del sitio de unión a *cap* de PB2 con 7mGTP unido. A) Diagrama de cintas de la estructura del dominio de unión a *cap* de PB2 (318-483 aa) en complejo con 7mGTP. La estructura secundaria de los elementos se indica con las hélices- α en rojo y las láminas- β en amarillo. El 7mGTP se representa como modelo de barras y bolas, igual que las cadenas laterales de los residuos Phe323, His357 y Phe404. Se han resaltado dos *loop* prominentes centrados en los residuos 348 y 424, así como los residuos de los extremos de la proteína (320 y 483). B) Vista alternativa de la estructura donde se destaca como el *loop*-424 proyecta hacia el solvente.

2.3. Estructura atómica del dominio de unión a *cap* de PB2 con el 7mGTP unido

El fragmento mínimo de unión a *cap* (318-483) fue cristalizado en presencia del análogo de *cap* 7mGTP por el laboratorio del Dr. Cusack y se resolvió la estructura atómica expresando la proteína parcialmente sustituida con selenometionina y por el método de difracción anómala de longitud de onda simple. La estructura se refinó a una resolución de 2,3 Å en un valor R de 0,186 ($R_{\text{libre}}=0,235$).

El dominio de unión a *cap* tiene un plegamiento α - β compacto y bien ordenado. Se caracteriza por una prominente lámina beta antiparalela de cinco cadenas ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$, $\beta 6$ y $\beta 7$) empaquetada contra un haz de cuatro hélices alfa ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) y flanqueado por láminas β cortas ($\beta 8$ - $\beta 12$) en el extremo C-terminal (Fig. R18).

El sitio de unión a 7mGTP está localizado en un extremo de la molécula, entre los subdominios de la lámina β y las hélices, y queda más definido

por una larga horquilla β entre las cadenas $\beta 3$ y $\beta 4$ y el *loop*-348 (Fig. R18A). Otro *loop* menos ordenado entre las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$, denominado *loop*-424, sobresale hacia el solvente. De acuerdo a bases de datos como DALI (Holm & Sander, 1993), la topología del plegamiento en conjunto es muy novedosa, lo cual es consistente con la ausencia de homología de secuencia de este dominio con cualquier otra proteína, excepto con PB2 de otros virus de la gripe.

Este bolsillo de PB2 formaría un “sándwich aromático” de características similares al descrito para otras proteínas que unen *cap* (ver Fig. In16). Entre las interacciones del análogo de *cap* 7mGTP con el bolsillo de unión de PB2 (Fig. R19) cabría destacar la agrupación hidrofóbica formada por cinco fenilalaninas (Phe-404, Phe-323, Phe-325, Phe-330 y Phe-363), siendo las más relevantes Phe-404 y Phe-323. Al otro lado del ligando, el sándwich se completaría con la His-357, de la hebra $\beta 4$, que se coloca paralela a la base a una distancia de 3,5 Å. Nunca se había descrito que una histidina, que es también un residuo aromático, tuviera este papel en otras

proteínas de unión a *cap*. Se observó también que el residuo Glu-361 es el responsable de proporcionar la carga ácida que estabiliza la carga positiva de la base del *cap*.

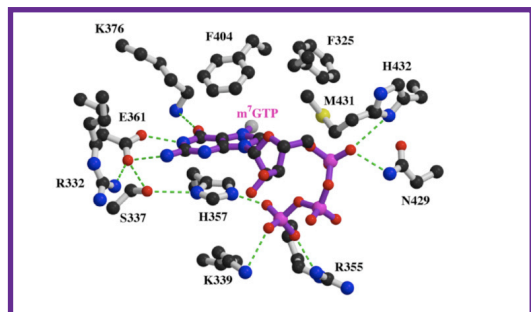


Figura R19. Interacciones del análogo de *cap* 7mGTP con el bolsillo de unión a *cap* de PB2. Modelo de bolas y barras donde se visualizan los residuos relevantes de PB2 para la interacción con el análogo de *cap* (en morado). Los puentes de hidrógeno posibles se muestran como líneas verdes discontinuas.

2.4. Análisis de la unión a *cap* en mutantes puntuales de PB2

Para verificar la relevancia funcional de la estructura descrita para este dominio de PB2, se generaron mutantes puntuales en los residuos que contactaban con 7mGTP (F323A, F325A, H357A, E361A, K376A y F404A) (**Fig. R20**) en el plásmido de expresión de la subunidad PB2 completa, pCMVPB2-His. Además, se generó el mutante H357W para emular un sitio de unión a *cap* como el de las otras proteínas descritas

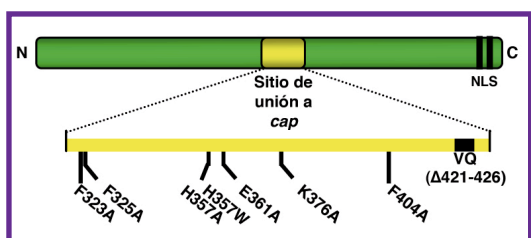


Figura R20. Diagrama de los mutantes puntuales generados en el sitio de unión a *cap* de la subunidad PB2.

y también un mutante de delección en el *loop*-424, denominado ΔVQ.

A continuación, se trasfectaron células HEK-293T con los plásmidos de expresión de las subunidades de polimerasa, incluyendo PB2 silvestre o los respectivos mutantes, y se analizó el extracto mediante cromatografía de afinidad a 7mGTP-S. De forma esperable, se observó una reducción en la capacidad de unión a estructuras *cap* en las polimerasas mutantes (**Fig. R21**), aunque no se detectó ningún cambio en la formación de complejo de polimerasa. El mutante H357W se comportó como el silvestre, mientras que las otras mutaciones abolían la unión. El mutante F325A y el mutante de delección ΔVQ mostraron un fenotipo intermedio, ya que se quedaban retenidos menos eficazmente que la polimerasa silvestre. Estos resultados confirman la relevancia de estos residuos para la unión al *cap*.

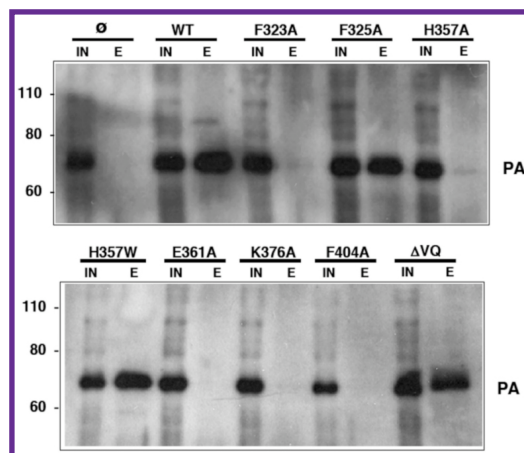


Figura R21. Capacidad de unión a *cap* de los complejos de polimerasa recombinante mutantes en el bolsillo de unión a *cap*. Cultivos de células HEK-293T se co-transfectaron con los plásmidos de expresión de PB1 y PA (ø) o se co-transfectaron con los de PB1, PB2, o sus mutantes, y PA. Los extractos celulares se analizaron por cromatografía de afinidad a 7mGTP-S eluyendo por competición con 7mGTP soluble. Se analizó el extracto total (In) y las eluciones (E) por WB anti-PA. La posición de la banda específica de PA se muestra a la derecha y la movilidad de los marcadores de peso molecular a la izquierda.

2.5. Análisis funcional *in vivo* de los mutantes en el sitio de unión a *cap*

El siguiente paso fue comprobar la capacidad de replicación de RNPs reconstituidas con estos mutantes. La actividad replicativa de estas RNPs recombinantes se testó midiendo la acumulación de las mismas *in vivo*. Para ello, se co-transfectaron células humanas HEK-293T con el plásmido de expresión de NP, el que expresa una secuencia tipo viral de 248 nt (pHHclone23) y los que codifican las subunidades de la polimerasa, incluyendo PB2 o los respectivos mutantes. Todos los plásmidos de expresión de

PB2 contienen una etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal de la proteína. Los extractos celulares se purificaron por cromatografía de afinidad a Ni^{2+} -NTA y se monitorizó la unión a la resina por WB utilizando anticuerpos específicos para PA y NP (Fig. R22). En este ensayo, la cantidad de RNPs recombinantes purificadas es una medida de su replicación *in vivo*, dado que cualquier mutación que anule la actividad de la polimerasa impide la generación de RNPs (Mena et al, 1994; Perales & Ortín, 1997). La mayoría de mutaciones no alteran sustancialmente la actividad replicativa de las RNPs, aunque las mutaciones F325A y K376A reducen parcialmente la acumulación de RNPs (Fig. R22B).

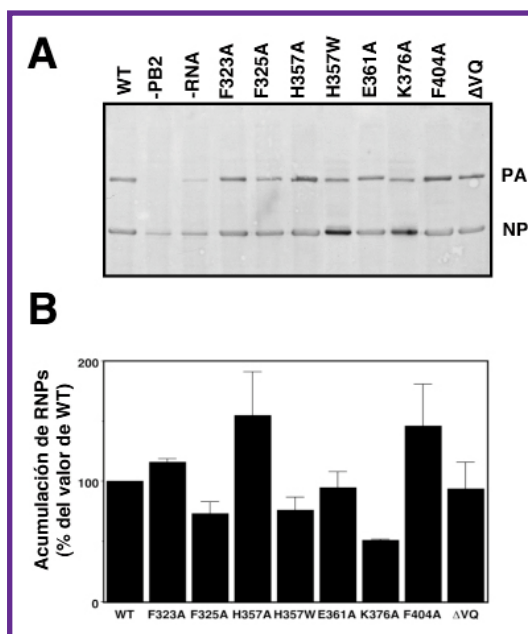


Figura R22. Análisis funcional *in vivo* de mini-RNPs recombinantes mutantes en el sitio de unión a *cap*. A) Se analizó la capacidad replicativa de RNPs con las mutaciones en el sitio de unión a *cap* midiendo la acumulación de las mismas. Se reconstituyeron *in vivo* miniRNPs silvestres (wt) o mutantes transfectando el plásmido pHHclone23 para generar un RNA molde de 248 nt, y los plásmidos de expresión de PB1, PB2, o los respectivos mutantes, PA y NP. Se incluyeron dos controles negativos, uno en el que no se transfectó PB2 (-PB2) y otro en el que no se transfectó pHHclone23 (-RNA). Se purificaron los extractos por cromatografía de afinidad a Ni^{2+} -NTA y se determinó la acumulación de RNPs progenie por WB anti- PA y anti-NP. B) Se muestran las medias y rangos de dos experimentos independientes.

2.6. Análisis funcional *in vitro* de los mutantes en el sitio de unión a *cap*

Dado que la capacidad replicativa de estas RNPs recombinantes no estaba afectada, se analizó la actividad transcripcional de éstas mediante un ensayo de transcripción *in vitro* usando las RNPs purificadas por cromatografía de afinidad a Ni^{2+} -NTA como enzima-molde. Como iniciador de la transcripción se usó ApG o mRNA de β globina para emular la transcripción independiente o dependiente de *cap*, respectivamente. Las RNPs mutantes fueron totalmente activas cuando se inició la transcripción con ApG (Fig. R23A). Las mutaciones H357A y F404A generaron RNPs que eran transcripcionalmente más eficientes que la forma silvestre, y únicamente el mutante F325A mostró una deficiencia fuerte, tal y como se había descrito previamente (Fechter et al, 2003). En contraste, la transcripción dependiente de mRNA de β globina se vio afectada severamente en la mayoría de los mutantes, excepto las mutaciones H357W y H357A, que eran total o parcialmente activas, respectivamente (Fig. R23B).

La relación de la actividad transcripcional

iniciada por mRNA de β globina respecto a la iniciada por ApG (Fig. R23C) muestra que todos los mutantes, excepto H357W, estaban fuertemente afectados en su capacidad de utilizar este mRNA como iniciador de la

transcripción. Esto significa que la transcripción dependiente de *cap* se reduce al mutar los residuos más relevantes del dominio de unión a *cap* descrito estructuralmente.

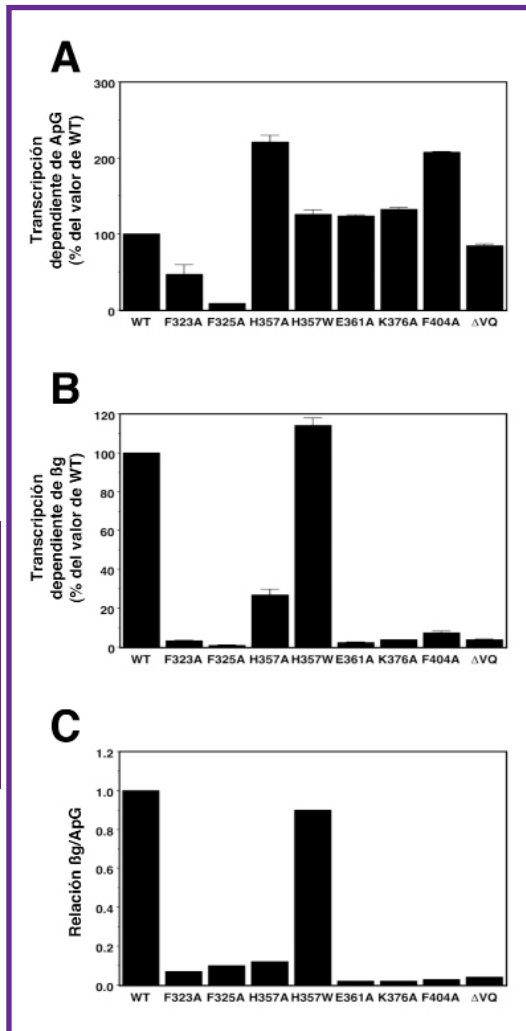


Figura R23. Análisis funcional *in vitro* de mini-RNPs recombinantes mutantes en el sitio de unión a *cap*. Se reconstituyeron *in vivo* miniRNPs silvestres (wt) o mutantes co-transfectando el plásmido pHHclone23 y los plásmidos de expresión de PB1, PB2, o los respectivos mutantes, PA y NP. Se purificaron los extractos por cromatografía de afinidad a Ni^{2+} -NTA y se realizaron ensayos de transcripción *in vitro*. **A)** Se usó ApG como iniciador de la transcripción. **B)** Se usó mRNA de β globina como iniciador de la transcripción. **C)** Relación de la actividad transcripcional dependiente de ApG versus dependiente de mRNA de β globina. Se muestran las medias y rangos de dos experimentos independientes.

3. Análisis de las señales de localización nuclear de PB2

En la primera sección de Resultados se ha descrito la estructura del complejo de polimerasa a baja resolución por ME. Mientras se sigue trabajando en la obtención de un modelo estructural a nivel atómico, se ha propuesto modelar la estructura del complejo de polimerasa determinando la de pequeños fragmentos del mismo, como el que se describe en el segundo apartado de Resultados, para luego ubicarlos en el volumen del complejo. Pero una de las preguntas remanentes es cómo y dónde se forma este complejo heterotrimérico de la polimerasa.

Como se describe en la Introducción de esta Tesis, hay diversas hipótesis al respecto (Fig. In11). La hipótesis con más evidencias experimentales propone que primero se formaría el heterodímero PB1-PA en el citoplasma y se transportaría al núcleo. Mientras, de forma independiente, se transportaría la subunidad PB2. Para que se lleve a cabo este transporte harían falta diversos factores celulares, como importinas. También en la Introducción (Fig. In10B), se refiere a la reciente publicación del co-cristal del fragmento C-terminal de PB2, que contiene la NLS bipartita de PB2, con la importina $\alpha 5$ (Tarendeau et al, 2007). Estos datos sugieren que la entrada de PB2 al núcleo podría estar mediada por la interacción con importina α a través de la NLS bipartita. Para estudiar esta hipótesis, se decidió alterar esta NLS bipartita y analizar sus efectos en el transporte, la formación de complejo y la actividad de la polimerasa.

3.1. Análisis de la localización intracelular de los mutantes puntuales en la NLS de PB2

Para estudiar las posibles funciones de la

interacción PB2-Importinas α se generaron mutantes de PB2 en la NLS bipartita. Se construyeron mutantes en la NLS-1 (R737Q -mutante 737- o K738Q -mutante 738-), en la NLS-2 (K752N+R755Q -mutante KNRQ-) o en ambas regiones (K738Q+K752N+R755Q -mutante 8/K-). Estas mutaciones habían sido descritas previamente en base a la estructura del co-cristal del dominio NLS de PB2 unido a importina α y se observó que la interacción de estos elementos disminuía progresivamente según se introducían las mutaciones (Tarendeau et al, 2007). Además, se produjo un mutante de delección en el que se había eliminado la NLS completa -mutante Δ NLS- (Fig. R24A).

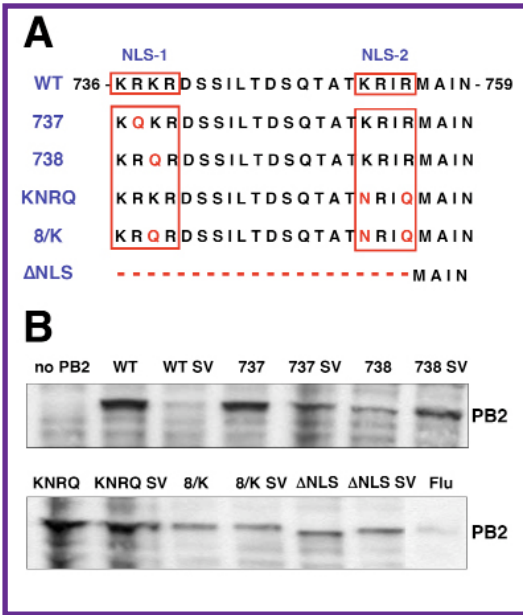


Figura R24. Análisis de la expresión de los mutantes de PB2 en la NLS. A) Secuencia de la NLS de PB2 próxima al extremo C-terminal. Se indica la posición de las dos regiones de la NLS bipartita (NLS-1 y NLS-2), así como los cambios realizados en los mutantes 737, 738, KNRQ, 8/K y Δ NLS. **B)** Se analizó el extracto total de células HEK-293T transfectadas con los plásmidos expresión de PB2 silvestre o mutante mediante WB anti-PB2. PB2 se omitió como control negativo (no PB2). SV significa que se insertó en el extremo C-terminal de PB2 una NLS adicional derivada del TAG de SV40. Se usó el extracto de células infectadas con gripe como marcador de movilidad (Flu). La posición de la banda específica de PB2 se indica a la derecha.

Para verificar que todas las proteínas PB2 mutantes se expresaban correctamente se analizó mediante WB su acumulación en células HEK-293T transfectadas (Fig. R24B). Además, se analizó su transporte al núcleo en células HeLa mediante inmunofluorescencia indirecta con

anticuerpos específicos anti-PB2. En la Fig. R25A se presentan imágenes representativas y en la Fig. R25B un resumen de los fenotipos. Estos resultados son consistentes con los presentados para los mutantes del dominio C-terminal de PB2 fusionado a GFP (Tarendeau et al, 2007) e indican que la acumulación nuclear de la proteína PB2 está ligeramente afectada por las mutaciones puntuales en la NLS-1 y mucho más inhibida por una mutación doble en la NLS-2. Así, sólo se observó una pequeña tinción del citoplasma en los mutantes 737 y 738, mientras que los mutantes KNRQ y 8/K tenían concentraciones similares de PB2 en el núcleo y en el citoplasma. Incluso el mutante Δ NLS mostraba cierta tinción nuclear. Se observaron fenotipos similares en células HEK-293T (Fig. R25C).

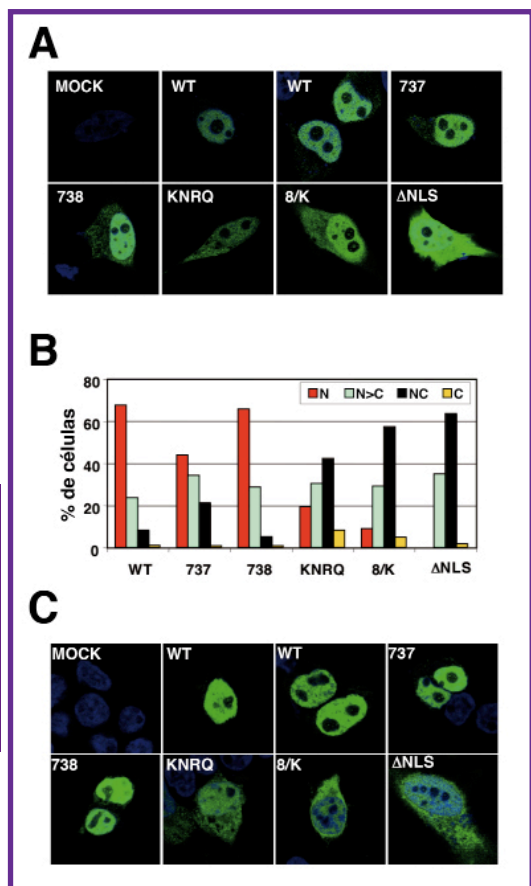


Figura R25. Localización intracelular de los mutantes de PB2 en la NLS. A) Localizaciones intracelulares representativas de las proteínas PB2 silvestre o mutantes. Se presentan secciones ópticas de células HeLa pseudo-transfectadas (MOCK), transfectadas con PB2 silvestre (wt) o con cada una de las proteínas PB2 mutantes. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y PB2 con anticuerpos monoclonales anti-PB2 y anticuerpos anti-ratón de cabra acoplados a Alexa 488 (verde). B) Estimación cuantitativa de la localización de las proteínas PB2 silvestre o mutantes. Alrededor de 100 células se clasificaron en: N, exclusivamente nuclear; N>C, núcleos más teñidos que el citoplasma; NC, núcleo y citoplasma igualmente teñidos; C, tinción exclusivamente citoplásmica. C) Localizaciones intracelulares representativas de las proteínas PB2 silvestre (wt) o mutantes en células HEK-293T. Se tiñeron de la misma manera que en Fig. R25A.

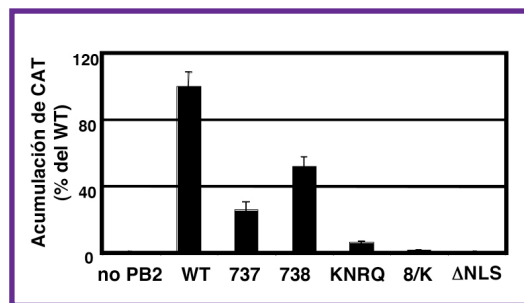


Figura R26. Análisis de la actividad biológica de RNPs recombinantes con las proteínas PB2 mutantes en la NLS. Cultivos de células HEK-293T se cotransfectaron con los plásmidos expresión de PB1, PA, NP y PB2 silvestre o mutante, así como un plásmido que codifica el gen de CAT en polaridad negativa, flanqueado por las regiones no traducidas del segmento NS de gripe, que proporcionará el RNA molde. Como control negativo no se transfectó el plásmido de expresión de PB2 (no PB2). Se determinó la actividad biológica midiendo la acumulación de proteína CAT en los extractos celulares mediante ELISA. En la gráfica se muestran los valores de acumulación de proteína CAT de las RNPs mutantes respecto a la silvestre como porcentaje del valor obtenido para la silvestre (wt). Se muestran las medias y desviaciones de estándar de 3-9 experimentos independientes.

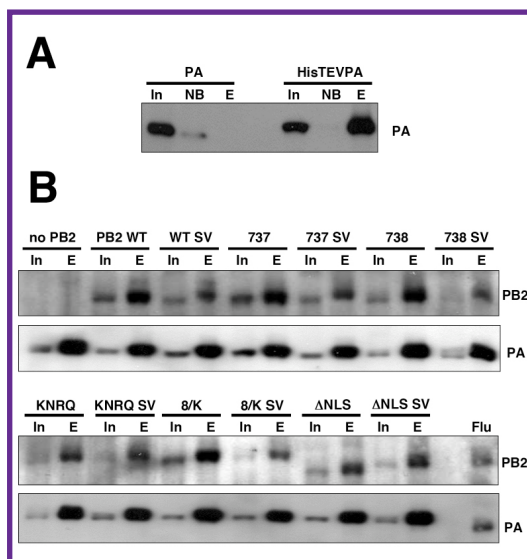


Figura R27. Análisis de la formación de complejo de polimerasa con PB2 mutante en la NLS. Se co-transfectaron células HEK-293T con los plásmidos de expresión de PB1, HisTEVPA o PA como control, y PB2 silvestre o mutante. PB2 se omitió como control negativo (no PB2). Se prepararon los extractos totales y se analizaron por cromatografía de afinidad a Ni^{2+} -NTA y WB anti-PB2 y anti-PA. **A)** Controles del experimento de la purificación. **B)** Análisis de los mutantes de PB2. In: extracto total; NB: no unido a Ni^{2+} -NTA; E: eluciones de la columna Ni^{2+} -NTA. SV significa que se insertó en el extremo C-terminal de PB2 una NLS adicional derivada del TAG de SV40. Se usó el extracto de células infectadas con gripe como marcador de movilidad (Flu). La posición de las bandas específicas de cada proteína se indica a la derecha.

3.2. Análisis funcional *in vivo* de las mutaciones en la NLS de PB2

La actividad biológica de estos mutantes se analizó primero en un sistema de replicación mediante un replicón viral que contiene el gen de la proteína CAT. Las células se transfectaron con los plásmidos que codifican cada una de las subunidades de la polimerasa, la NP y el replicón recombinante. Se usó PB2 silvestre o los mutantes, mientras que el plásmido de PB2 se omitió como control negativo. Se usó la acumulación de proteína CAT en la célula como una medida indirecta de las actividades replicación-transcripción combinadas de cada RNP recombinante. Los resultados obtenidos

se presentan en la **Fig. R26** y muestran que mutaciones en la NLS de PB2 llevan a un fenotipo más acusado que el esperado de la localización celular de la proteína. Así, los mutantes 737 y 738, que tenían una localización difícilmente distinguible de PB2 silvestre (**Fig. R25 A y C**), generaron RNPs 2-4 veces menos activas que las RNPs silvestres. Por otro lado, los mutantes KNRQ y 8/K, que aún mostraban una acumulación considerable de PB2 en el núcleo (**Fig. R25A y C**), formaron RNPs 10-100 veces menos activas que las silvestres. Además, el mutante Δ NLS, que no estaba completamente excluido del núcleo, era completamente inactivo.

Estos resultados indican que hay una correlación entre la progresiva reducción de la interacción del dominio de PB2 mutado con la importina α (Tarendeau et al, 2007) y la disminución de la actividad las RNPs mutantes. Sin embargo, el carácter tan marcado del fenotipo de actividad sugiere que el defecto en la localización intracelular de PB2 no es la única causa para la reducción de la actividad de la RNP mutante, llevándonos al análisis de otras alternativas. La explicación más sencilla sería que el complejo de polimerasa no se forma en los mutantes de PB2 afectados en la NLS. Por consiguiente, se estudió esta posibilidad por co-transfección de los plásmidos que expresan PB1, HisTEVPA y PB2 silvestre o mutante, y cromatografía de afinidad a Ni^{2+} -NTA. La formación de complejo se determinó por WB con anticuerpos anti-PB2 y se muestra en la **Fig. R27**. No se observaron diferencias significativas en la capacidad de las proteínas PB2 mutantes o silvestre para producir complejos de polimerasa. Así, podemos concluir que las mutaciones puntuales en la NLS de PB2 no alteran la formación de complejo de polimerasa, pero eliminan la actividad de RNPs virales.

3.3. Análisis del efecto de la inserción de una NLS ectópica en extremo C-terminal de los mutantes de PB2 en la NLS

Para distinguir si la interacción de las importinas α con la NLS C-terminal de PB2 es

únicamente importante para su acumulación nuclear o si además juega algún papel adicional en la actividad de las RNPs del virus, se intentó rescatar la localización nuclear de los mutantes de PB2 mediante la inserción ectópica de una NLS alternativa. De este modo, se insertó la NLS del TAG de SV40 en el extremo C-terminal de la proteína PB2 silvestre o mutante (**Fig. R28A**) y se testó la localización intracelular de los mutantes más afectados (KNRQ, 8/K y Δ NLS) mediante inmunofluorescencia indirecta en células transfectadas. Tal y como se esperaba, se mantuvo la localización nuclear en la proteína silvestre y se rescató para las proteínas mutantes KNRQ y 8/K que contenían la NLS del TAG de SV40 (**Fig. R28B, C**). Dado que el rescate de Δ NLS no fue completo, no se continuó analizando.

Tras verificar que las proteínas PB2 con la NLS del TAG de SV40 formaban complejos heterotriméricos de polimerasa eficientemente (**Fig. R27**), se analizó la localización intracelular de las proteínas PB2 silvestre o mutantes en células que co-expresaban las otras subunidades de la polimerasa. Así, se co-transfectaron cultivos de células HEK-293T con los plásmidos que expresaban las proteínas PB1, PA y PB2 silvestre o mutante con el fenotipo más fuerte (KNRQ SV o 8/K SV). Previamente se había mostrado que el transporte de las proteínas PB1-PA y PB2 son independientes (Deng et al, 2005; Fodor & Smith, 2004), así que las células transfectadas se analizaron por inmunofluorescencia de doble tinción con anticuerpos específicos para PB1 y PB2 (**Fig. R29**). Los resultados mostraron que ambas proteínas PB2, silvestre y mutante, con la NLS del TAG de SV40 se localizaron en el núcleo en células positivas para la tinción con PB1. Estos resultados indican que ni las mutaciones puntuales en la NLS ni la inserción de la NLS del Tag de SV40 alteraron significativamente la capacidad de PB2 para formar complejo de polimerasa (**Fig. R27**) o su transporte al núcleo (**Fig. R29**).

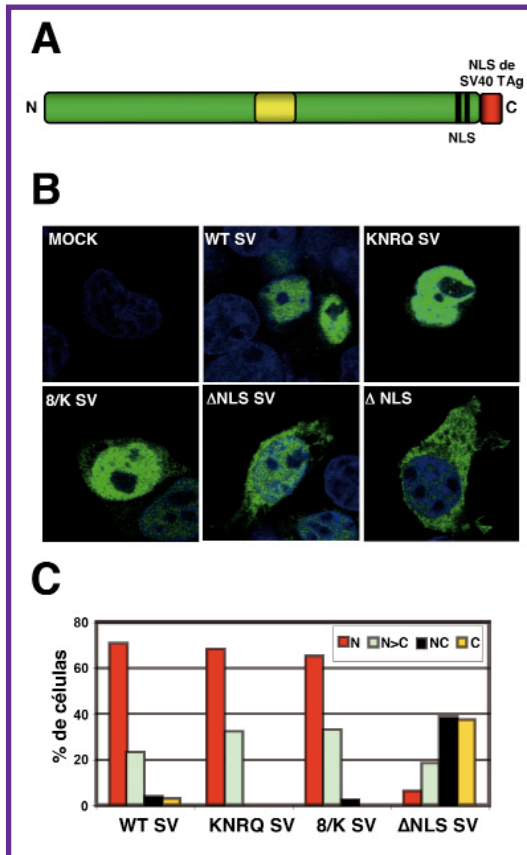


Figura R28. Localización intracelular de las proteínas PB2 mutantes en la NLS con una NLS ectópica. A) Diagrama de la proteína PB2 con la NLS del TAG de SV40 en el extremo C-terminal. B) Fenotipos representativos de la localización intracelular de PB2 silvestre o mutantes. Se presentan secciones ópticas de células HEK-293T pseudo-transfectadas (MOCK), transfectadas con PB2 silvestre (wt) o con cada una de las proteínas PB2 mutantes conteniendo una señal NLS adicional en el extremo C-terminal de la proteína. Se muestra también el fenotipo de Δ NLS sin la NLS del TAG de SV40. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y PB2 con anticuerpos monoclonales anti-PB2 y anticuerpos anti-ratón de cabra acoplados a Alexa 488 (verde). C) Estimación cuantitativa de la localización de las proteínas PB2 silvestre o mutantes con la NLS ectópica tal y como se describe en Fig. R25B.

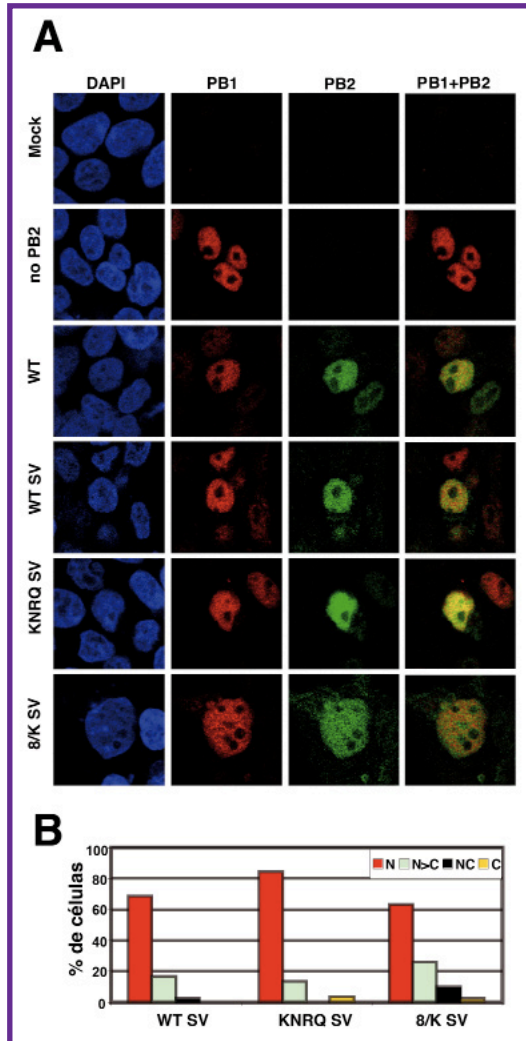


Figura R29. Localización intracelular de las proteína PB2 mutante en la NLS en células co-expresando las otras subunidades de la polimerasa. A) Cultivos de células HEK-293T se co-transfectaron con los plásmidos que expresaban PB1, PA y PB2 silvestre o mutante con la NLS ectópica del TAG de SV40. Los cultivos se fijaron y analizaron por doble inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos para las proteínas PB1 y PB2. Se muestran las señales de tinción nuclear (DAPI, azul), de la proteína PB1 (PB1, rojo), de la proteína PB2 (PB2, verde) y la mezcla de PB1 y PB2. Se muestran células pseudo-transfectadas (MOCK), que expresan PB1 y PA (no PB2), que expresan la polimerasa silvestre (wt) o células que expresan la polimerasa con la proteína PB2-SV (wt sv) o células que expresan la polimerasa con cada una de las PB2 mutantes con la NLS adicional del TAG de SV40. B) Estimación cuantitativa de la localización de las proteínas PB2 silvestre o mutantes tal y como se describe en Fig. R25B.

La actividad de cada una de las RNPs mutantes rescatadas con la inserción de la NLS ectópica se analizó de nuevo por el ensayo de minireplicón de CAT descrito anteriormente. Los resultados se presentan en la **Fig. R30**. Esta inserción llevó a una disminución de 2-3 veces de acumulación de CAT y se observaron reducciones similares para los mutantes KNRQ y 8/K (**Fig. R30**). Por otro lado, no se rescató la expresión de CAT por la inserción de la NLS adicional en las RNPs con las mutaciones KNRQ y 8/K en PB2, a pesar de la casi completa localización nuclear de estas proteínas PB2 mutantes.

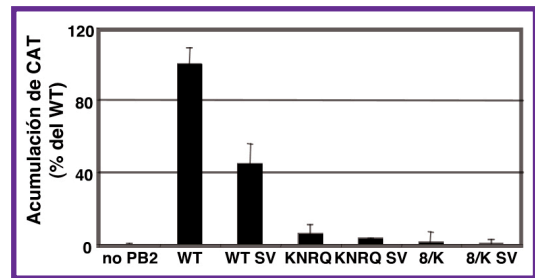


Figura R30. Análisis de la actividad biológica de RNPs recombinantes con una NLS ectópica en la proteína PB2. Cultivos de células HEK-293T se co-transfectaron con plásmidos que expresaban PB1, PA, NP y PB2 silvestre o mutante, con o sin la NLS del TAG de SV40 adicional fusionada al extremo C-terminal de la proteína. Además, se co-transfectó un plásmido que codifica el gen de CAT en polaridad negativa, flanqueado por las regiones no traducidas del segmento NS de gripe, que proporcionó el RNA molde. Como control negativo se omitió el plásmido que expresaba PB2 (no PB2). Se determinó la actividad biológica midiendo la acumulación de proteína CAT en los extractos celulares mediante ELISA. En la gráfica se muestran los valores de acumulación de proteína CAT de las RNPs mutantes respecto a la silvestre como porcentaje del valor obtenido para la silvestre (wt). Se muestran las medias y desviaciones de estándar de 3-9 experimentos independientes.

Por consiguiente, se puede concluir que la reducción en la localización nuclear de los mutantes de PB2 no es la principal causa de la falta de actividad de las RNPs. Por tanto, estos resultados sugieren que las mutaciones en la NLS deben afectar un paso posterior al transporte

al núcleo, probablemente la replicación o transcripción del RNA.

3.4. Análisis de la replicación del RNA viral en los mutantes en la NLS de PB2

Para determinar qué paso de la replicación viral requería la interacción de la polimerasa viral con la importina α , se reconstituyeron RNPs *in vivo*, de modo similar al realizado en el análisis de los mutantes de unión a *cap*. Como replicón se usó un RNA de 248 nt en polaridad negativa derivado de RNA viral y contenido en el plásmido pHHclone23. Los cultivos celulares se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas PA, NP y PB2 silvestre o mutante con la NLS adicional del TAg de SV40. Para permitir la purificación de las RNPs, se co-expresó una proteína PB1 con la etiqueta TAP; alternativamente, se usó una PB1 sin etiqueta como control negativo. De esta manera, las RNPs progenie podrían unirse a IgG-Sepharose y ser eluidas específicamente por digestión con la proteasa TEV. La acumulación de RNPs virales se midió por WB con anticuerpos específicos para NP (Fig. R31A, B). Los resultados mostraron claramente que la acumulación de RNPs *in vivo* fue prácticamente anulada al introducir en PB2 las mutaciones KNRQ y 8/K. Estos resultados se confirmaron mediante la determinación de la actividad transcripcional de estas RNPs purificadas. En la Fig. R31C se presenta la media y desviación estándar de tres experimentos de purificación independientes, de nuevo mostrando que esencialmente no hubo acumulación de RNPs cuando se introdujeron las mutaciones KNRQ y 8/K en PB2.

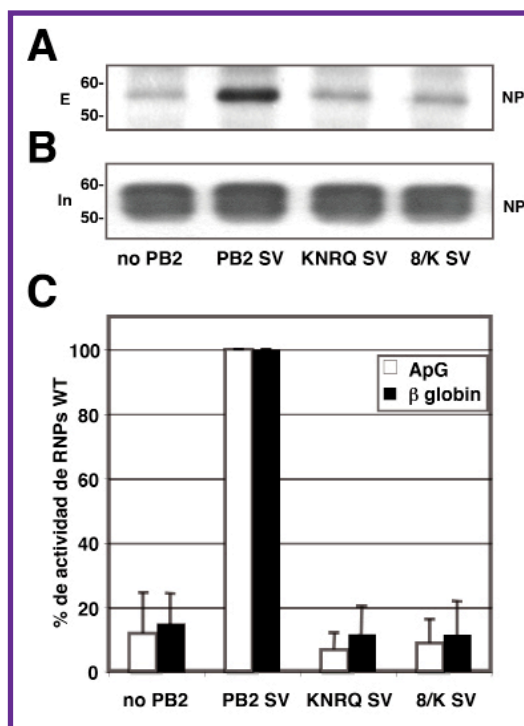


Figura R31. Análisis funcional *in vivo* de mini-RNPs recombinantes con una NLS ectópica en la proteína PB2. Se analizó la capacidad replicativa de RNPs con las mutaciones en la NLS de PB2 midiendo la acumulación de las mismas. Se cotransfectaron células HEK-293T con los plásmidos de expresión de PB1-TAP o PB1, PA, NP y PB2 silvestre o mutante con la NLS adicional del TAg de SV40, así como el plásmido pHHclone23 para la generación de un RNA molde de 248 nt. Como control negativo se omitió el plásmido que expresaba PB2 (no PB2). Las RNPs progenie se purificaron por cromatografía de afinidad en resina IgG-Sepharose y corte con proteasa TEV. **A)** Determinación de la acumulación de RNPs progenie purificadas por WB anti-NP. **B)** NP total presente en los extractos celulares antes de la purificación. La posición de la banda específica de NP se indica a la derecha y la movilidad de los marcadores de peso molecular a la izquierda. **C)** Determinación de la acumulación de RNPs mediante un ensayo de transcripción *in vitro* utilizando como iniciador ApG (barras blancas) o mRNA de β globina (barras negras). Los datos presentan las medias y desviaciones estándar de tres experimentos independientes.



DISCUSIÓN

Más vale encender una luz
que maldecir la oscuridad.

Confucio

1. Profundizando en el ciclo viral: Cómo la RNP inicia la transcripción

Las características generales del ciclo de infección del virus de la gripe se presentan en la Introducción (Fig. In7), pero aún se desconocen muchos detalles de los distintos procesos que lo constituyen. Los virus de la gripe se adhieren a la superficie de células susceptibles y entran por endocitosis. Tras la fusión de las membranas del virus y el endosoma, las RNPs liberadas en el citoplasma son transportadas al núcleo, donde se llevarán a cabo los procesos de replicación y transcripción del genoma viral. En la transcripción primaria se sintetizarán los primeros mRNAs virales (Fig. In7-4) a partir de las RNPs paternas. El primer paso en este proceso consiste en el reconocimiento y unión del *cap* de pre-mRNAs celulares vía la subunidad PB2, seguido del *cap-snatching* de los mismos (Fig. In15).

Tal y como se demuestra en el segundo apartado de Resultados de esta Tesis, se ha identificado el dominio mínimo de unión a *cap* de PB2 y se ha caracterizado funcionalmente

mediante mutaciones puntuales que demuestran inequívocamente la relevancia funcional de este dominio en la iniciación de la transcripción. Esto se concluye del hecho que mutaciones deletéreas para la unión a *cap* tengan poco efecto en la replicación *in vivo* de las RNPs y en la actividad transcripcional *in vitro* iniciada con ApG, pero reduzcan o eliminen la capacidad de usar mRNA de β globina como donante de *cap* (Fig. R23). Estos resultados se resumen en la Tabla D1.

1.1. Características estructurales del dominio de unión a *cap* de PB2

A pesar de que el dominio de unión a *cap* posee un plegamiento distinto a cualquiera previamente descrito, el modo específico de reconocimiento de la base se parece al de otras proteínas de unión a *cap* bien caracterizadas como son eIF4E, el complejo de unión a *cap* nuclear (CBC) y la proteína VP39 del virus *Vaccinia* (Fechter & Brownlee, 2005) (Fig. In16). En estas proteínas, el 7mG se empaqueta entre dos residuos aromáticos, siendo uno de ellos un triptófano o una tirosina (Trp-Trp en eIF4E, Tyr-Tyr en CBC y Tyr-Phe en VP39). Esto da lugar a fuertes interacciones electrostáticas entre

	Unión a CAP de la Polimerasa 4°C	Replicación del RNA	Transcripción dependiente de ApG	Transcripción dependiente de β -globina	Relación transcripción β -globin/ApG
WT	+++	+++	+++	+++	+++
F323A	-	+++	+	-	-
F325A	++	++	-	-	-
H357A	-	++++	++++	+	-
H357W	+++	++	+++	++++	+++
E361A	-	+++	+++	-	-
K376A	-	+	+++	-	-
F404A	-	++++	++++	-	-
Δ VQ	+	+++	++	-	-

Tabla D1. Resumen de la actividad bioquímica y biológica de los mutantes de unión a *cap* de PB2.

la base metilada cargada positivamente y los electrones π aromáticos, proporcionando una discriminación de hasta 100 veces frente a una base no metilada. El sitio de unión a *cap* de PB2 descrito en esta Memoria muestra también un empaquetamiento aromático de la base metilada y un residuo ácido crucial que hace específicas las interacciones con la base (Fig. R19). Este sitio incluye los residuos Phe363 y Phe404, cuya importancia en la unión a *cap* ha sido demostrada previamente (Fechter et al, 2003). Esta Phe404 y otros residuos esenciales para la unión a *cap* están funcionalmente, si no absolutamente, conservados en todos los virus de la gripe A, B y C (Guilligay et al, 2008). Sin embargo, el residuo His357, al otro lado del sándwich de la base metilada, es único en gripe A, mientras que en B y C es sustituido por triptófano, residuo más convencional en la unión a *cap*.

1.2. La unión a *cap* es termosensible

Para analizar la capacidad de unión a *cap* de este bolsillo de forma cuantitativa, el Dr. Lewis se encargó de la realización de ensayos de Surface Plasmon Resonance (SPR) (Guilligay et al, 2008). Estos estudios se hicieron con el fragmento de PB2 entre los residuos 320-483 purificado en el laboratorio del Dr. Cusack, ya que no pudo conseguirse concentración suficiente de complejo de polimerasa completa purificada para este tipo de análisis. En estos ensayos se inmovilizó el fragmento de PB2 purificado o los respectivos mutantes en la superficie del sensor y a continuación se incubó con diluciones seriadas de análogos de *cap*. Los resultados coincidieron con los obtenidos en el ensayo de unión a la resina 7mGTP-S, siendo el de mayor afinidad el mutante H357W y los de menor E361A y K376A (Tabla D1, Fig. R21). Además se determinó que la unión a *cap* era dependiente de temperatura, es decir que la afinidad por la unión a *cap*

disminuye al aumentar la temperatura, siendo este fenotipo mucho más acusado en el mutante F325A.

1.3. Otras regiones del complejo de la polimerasa deben estar implicadas en la regulación de la unión al *cap*

En estudios previos realizados por otros grupos se habían determinado otras regiones de PB2 como implicadas en la unión a *cap* (Honda et al, 1999; Li et al, 2001) (Fig. In10A). Estos análisis se hicieron mediante ensayos de *crosslinking* a oligonucleótidos con *cap* marcado radiativamente y es posible que esas regiones identificadas estén espacialmente cercanas al bolsillo de unión a *cap* pero más implicadas en la unión al RNA que específicamente en el reconocimiento de la base.

Sin embargo, aunque se haya demostrado la existencia de un dominio de plegamiento independiente en PB2 con actividad de unión a *cap* específica, el contexto del sitio de unión a *cap* en la polimerasa completa es realmente más complicado y debe haber otros dominios implicados en la regulación de su afinidad. De hecho, los análisis de SPR concluyen que la afinidad de este dominio por el análogo de *cap* es menor que para las proteínas eIF4E o CBC (Niedzwiecka et al, 2002; Worch et al, 2005), mientras que en los experimentos de optimización de la cromatografía de afinidad a 7mGTP-S se observó que para competir la unión de la polimerasa a la resina se requería mayor concentración de 7mGTP soluble que para competir eIF4E. Esto indica que la afinidad del complejo de polimerasa por la estructura tipo *cap* es mayor que la de la proteína de unión a *cap* celular.

1.4. El *loop* 424 del dominio de unión a *cap* de PB2 podría tener un papel relevante en la comunicación alostérica entre las subunidades de la polimerasa

Como se puede observar en la **Tabla D1** y en la **Fig. R20**, se investigó la posible función del *loop* 424 dado que parecía una estructura relevante por su proyección hacia el solvente y su conservación entre distintas cepas de influenza A y B. Para analizar su relevancia se acortó el *loop* sustituyendo los residuos Val421-Gln426 por tres glicinas (mutante ΔVQ). En el contexto de la polimerasa y de la RNP recombinantes, este mutante mantiene la capacidad de unirse a resina con análogo de *cap*, aunque un poco reducida (**Fig. R21**), y el rendimiento en replicación y actividad transcripcional dependiente de ApG es similar al silvestre (**Fig. R22, 23**). En contraste, el mutante es incapaz de llevar a cabo una transcripción *in vitro* dependiente de mRNA de β globina. Así, el mutante ΔVQ es defectivo en transcripción dependiente de *cap* pero no en la unión a *cap* (**Tabla D1**). Esto implica que el efecto de esta mutación se produce después de la unión de la polimerasa al *cap*, pero antes del inicio de la transcripción, por ello se especula que este *loop* podría tener un papel en la regulación del *cap-snatching*.

Recientemente se ha publicado que el dominio N-terminal de PA tiene actividad nucleasa y que su estructura es muy parecida a las nucleasas tipo II (Dias et al, 2009; Yuan et al, 2009). Además, se concluye que la subunidad responsable del corte endonucleotídico del *cap-snatching* es PA y no PB1, como se había descrito anteriormente (Li et al, 1998). Por otro lado, diversos estudios han demostrado que los cambios alostéricos, inducidos por la unión del extremo 5' del RNA viral o por el *cap*, están implicados en la activación de la transcripción por la polimerasa del virus de la gripe (Cianci et al, 1997; Kawakami et al, 1985; Li et al, 1998; Penn & Mahy, 1984). Los resultados

presentados sugieren que el *loop* 424 podría ser relevante en la comunicación alostérica entre las distintas subunidades del complejo por la contribución directa o indirecta en la activación de la endonucleasa y/o elongación del RNA.

1.5. Nuevas dianas para el desarrollo de compuestos antigripales

Los ensayos funcionales con los mutantes en el dominio de unión a *cap* de PB2 muestran claramente que la disrupción del dominio inhibe la transcripción viral dependiente de *cap*. Así, el sitio de unión de este ligando sería una diana válida en el desarrollo de nuevos compuestos para combatir la gripe, que son urgentemente requeridos dadas las continuas amenazas de una nueva pandemia devastadora. Aunque la polimerasa ha sido reconocida como una potencial diana en diversas ocasiones (De Clercq, 2006; Hooker et al, 2003; Luo et al, 1997), la dificultad de producir material analizable, la incomodidad relativa de los ensayos de *cross-linking* hasta ahora disponibles y la falta de información estructural detallada de la polimerasa han dificultado el progreso en este sentido. El dominio de unión a *cap* de PB2, estructuralmente distinto de las proteínas de unión a *cap* del hospedador, podría ser ahora producido fácilmente en *E.coli*, permitiendo el análisis eficaz de alto rendimiento y la optimización de nuevos inhibidores de la multiplicación del virus basados en la estructura.

2. Profundizando en el ciclo viral: La formación del complejo heterotrimérico de la polimerasa y su translocación al núcleo

Una vez sintetizados los mRNAs virales en el núcleo de la célula hospedadora, son exportados al citoplasma para poder ser traducidos por la maquinaria celular (**Fig. In7-5,6**). Entre estos mRNAs están los de la polimerasa viral, cuyas subunidades deben formar un complejo heterotrimérico y se traslocados al núcleo para replicar y transcribir el genoma viral.

En el tercer apartado de resultados de esta Memoria se ha analizado la importancia de la señal de localización celular de la subunidad PB2 para interaccionar con importina α , demostrándose que dicha interacción no es sólo relevante para el transporte al núcleo de la subunidad, sino también para la funcionalidad correcta del complejo de polimerasa.

2.1. Las importinas α se asocian in vivo con la subunidad PB2 de la polimerasa de gripe

La subunidad PB2 contiene una señal de localización nuclear (NLS) bipartita comprendida entre los residuos 736-759 (Mukaigawa & Nayak, 1991). Esta subunidad es esencial para la replicación y la transcripción viral (Gastaminza et al, 2003; Lee et al, 2002; Perales & Ortín, 1997). Además, su gen es relevante en la determinación de rango de hospedador. De hecho, muchos estudios han demostrado que la polimerasa en su conjunto juega un papel importante en la especificidad de huésped, probablemente debido a la necesidad de adaptación de las subunidades a los factores celulares con los que interaccionan, como por ejemplo los factores de importación nuclear (Almond, 1977; Finkelstein et al, 2007; Gabriel et al, 2005; Gabriel et al, 2008;

Labadie et al, 2007; Li et al, 2005; Subbarao et al, 1993).

Entre los factores asociados a la subunidad PB2 se incluyen las importinas $\alpha 1$, $\alpha 5$ y $\alpha 7$ (Resa-Infante et al, 2008), concretamente la importina $\alpha 5$ fue co-cristalizada con el dominio C-terminal de PB2 (Tarendeau et al, 2007). A pesar de que las importinas $\alpha 1$ y $\alpha 5$ son bastante diferentes, los residuos implicados en la interacción con PB2 están muy conservados (Gabriel et al, 2008). Además, se ha descrito que la interacción de PB2 con importinas α es específica de especie, por lo que esta interacción podría ser un factor determinante del rango de hospedador (Resa-Infante et al, 2008). Así, la subunidad PB2 de origen humano es capaz de interaccionar con varias isoformas de importinas humanas, mientras que la misma subunidad de origen aviar sólo es capaz de interaccionar parcialmente con la importina $\alpha 1$. Cabe destacar que todas las subunidades de PB2 procedentes de distintas cepas aviares y humanas analizadas tienen la región de la NLS idéntica, de lo que se puede deducir que otras regiones de PB2 estarían implicadas en dicha interacción.

2.2. Mutaciones en la NLS de PB2 reducen la importación al núcleo de la subunidad y afectan fuertemente la actividad biológica de la polimerasa

De acuerdo a experimentos previos realizados con el dominio C-terminal de PB2 (Tarendeau et al, 2007), mutaciones en la NLS dieron lugar a una importación nuclear defectiva de las proteínas PB2 mutantes, aunque ninguna de las mutaciones conducía a la exclusión de la proteína del núcleo (**Fig. R25**). Sin embargo, su capacidad para formar complejo de polimerasa *in vivo* no estaba alterada (**Fig. R27**). A pesar de la formación de complejo de polimerasa, la actividad de las RNPs con las mutaciones en la

NLS de PB2 estaba progresivamente disminuida, en paralelo a la reducción de la capacidad de interacción con importina α (Tarendeau et al, 2007), como se refleja en la actividad de un replicón de CAT *in vivo* (Fig. R26).

Teniendo todo esto en cuenta, los resultados obtenidos sugieren que la interacción de las importinas α con la NLS C-terminal de PB2 podría tener un papel adicional durante la infección viral, distinto de su función esperable en la importación nuclear.

Una aproximación habitual para analizar la relevancia de un factor celular en una infección viral es disminuir su nivel de expresión por silenciamiento génico y análisis de las consecuencias en la replicación del virus. Este abordaje no sería útil en este caso porque la bajada de expresión de las importinas α podría reducir la acumulación nuclear de PB2 (y de otras proteínas celulares y virales) y llevaría a fenotipos indirectos no informativos. Como alternativa, se rescató la localización nuclear de los mutantes en la NLS de PB2 con la inserción de una NLS adicional derivada del TAg de SV40 (Fig. R28, 29) y se analizó si el rescate de los mutantes llevaba a la recuperación de la actividad biológica de las RNPs *in vivo*. Los resultados mostraron claramente que no hubo rescate (Fig. R30), lo cual indica que la localización nuclear dirigida indirectamente no es suficiente para la actividad de la RNP y sugiere que se requiere la unión correcta de las importinas α con la NLS correcta y completa de PB2.

La correlación entre (i) el fenotipo de importación de los distintos mutantes generados, (ii) su capacidad de interaccionar *in vitro* con importina α (Tarendeau et al, 2007) y (iii) la bajada de actividad de las RNPs que contienen mutantes, hace bastante improbable que el defecto funcional descrito aquí no esté relacionado con las alteraciones en las interacciones PB2-

importina α . Podría argumentarse que este resultado es consecuencia de la inserción de la NLS del TAg de SV40 en sí misma, que alteraría la actividad de las RNPs, pero esto también es improbable dado que (i) sólo disminuye dos veces la actividad de las RNPs silvestres (Fig. R30) y (ii) la inserción de cualquier etiqueta en el extremo C-terminal de PB2 (His, TAP, GFP) no altera la actividad de las RNPs (Area et al, 2004; Fodor & Smith, 2004; Guilligay et al, 2008).

2.3. La interacción PB2-importina α tiene un papel relevante en la replicación del RNA viral

Dado que la proteína PB2 está implicada en el reconocimiento del *cap* necesario para el *cap-snatching*, como se ha discutido previamente, se podría pensar que la interacción con las importinas α es importante para la iniciación de la transcripción. Sin embargo, las RNPs virales purificadas, derivadas de viriones o aisladas en un sistema recombinante como los usados previamente (Fig. R23), son capaces de transcribir *in vitro* eficazmente utilizando mRNA de β globina como iniciador (Area et al, 2004; Coloma et al, 2009), sugiriendo que la importina α no es un cofactor tan esencial en la transcripción viral, como quizás en la replicación. De hecho, los experimentos descritos en el tercer apartado de Resultados de esta Memoria revelaron que la alteración de la NLS de PB2 anula la acumulación de RNPs virales *in vivo* (Fig. R31).

Estos resultados son consistentes con la acumulación transitoria de importinas α en el núcleo de células infectadas (Gabriel et al, 2008) y son más fácilmente interpretables proponiendo que la importina α actúa como un cofactor en la replicación del RNA viral, aunque no podría excluirse que también desempeñe un papel importante durante la transcripción de las RNPs progenie.

Al menos dos modelos alternativos podrían proponerse para explicar el requerimiento de las importinas α : (i) la interacción completa de PB2 con importina α es necesaria para el correcto plegamiento de un complejo de polimerasa viral activo o (ii) esta interacción es necesaria para la replicación de las RNPs en sí misma. Serán necesarios más estudios para conocer la función que ejercen las importinas α durante el ciclo de infección.

2.4. Modelo de formación de complejo de polimerasa

Recientemente se ha demostrado que el ensamblaje eficiente de la polimerasa trimérica podría ser un factor limitante de gran importancia en la viabilidad del reordenamiento de los genes de la gripe (Li et al, 2008). Dado que el reordenamiento génico es un mecanismo evolutivo del virus que puede llevar a la generación de nuevas cepas de potencial pandémico, es de gran relevancia comprender con precisión los procesos que llevan a la formación de una polimerasa viral activa en el núcleo de células infectadas.

Aunque todavía no se conocen completamente los mecanismos de ensamblaje e importación nuclear, así como sus relaciones temporales y espaciales, a principios de este año se ha publicado un estudio *in vivo* en el que se demuestra que PB1 y PA forman un heterodímero en el citoplasma, mientras que PB2 permanece como monómero en este compartimento. La asociación PB1/PA con PB2, necesaria en la formación del complejo de polimerasa, únicamente fue detectada en el núcleo y cuando se alteró la importación nuclear de PB2 mutando su NLS, se indujo la presencia aberrante del trímero de polimerasa en el citoplasma (Huet et al, 2009). Estos resultados también se obtuvieron en nuestro laboratorio al hacer ensayos de localización intracelular por

inmunofluorescencia indirecta en el contexto de la polimerasa con los mutantes de PB2 en la NLS sin la NLS ectópica del TAG de SV40, observándose una localización perinuclear del complejo de la polimerasa (datos no mostrados).

En la célula existen diversas vías de transporte nuclear, cada una de las cuales transporta un rango específico de macromoléculas. La ruta clásica consiste en el reconocimiento de la NLS de la proteína a transportar por una importina α y esta a su vez se une a una importina β , que interaccionará con componentes del poro nuclear para que se lleve a cabo la translocación al núcleo (Stewart, 2007). Una posible explicación para que la localización de PB1 y PA se vea afectada por mutaciones en PB2 es que la formación del complejo de polimerasa tenga lugar en el citoplasma, con la subsiguiente importación nuclear dirigida en parte por la NLS de PB2. Según esta hipótesis, el transporte al núcleo del complejo de polimerasa sería muy rápido y podría estar mediado por la formación de un complejo pentamérico que incluiría RanBP5, miembro de la familia de importinas β , que interacciona con PB1/PA (Deng et al, 2006a) y la importina α que interacciona con PB2. Así, se propone un nuevo modelo para el ensamblaje del complejo de la polimerasa que tendría lugar en el citoplasma de la célula infectada, mediado en parte por la interacción entre la importina α y la β (Fig. D1). Según este modelo, las importinas α y β ejercerían una función de chaperonas específicas, colaborando en la correcta formación del complejo de polimerasa y no sólo en el transporte de las subunidades.

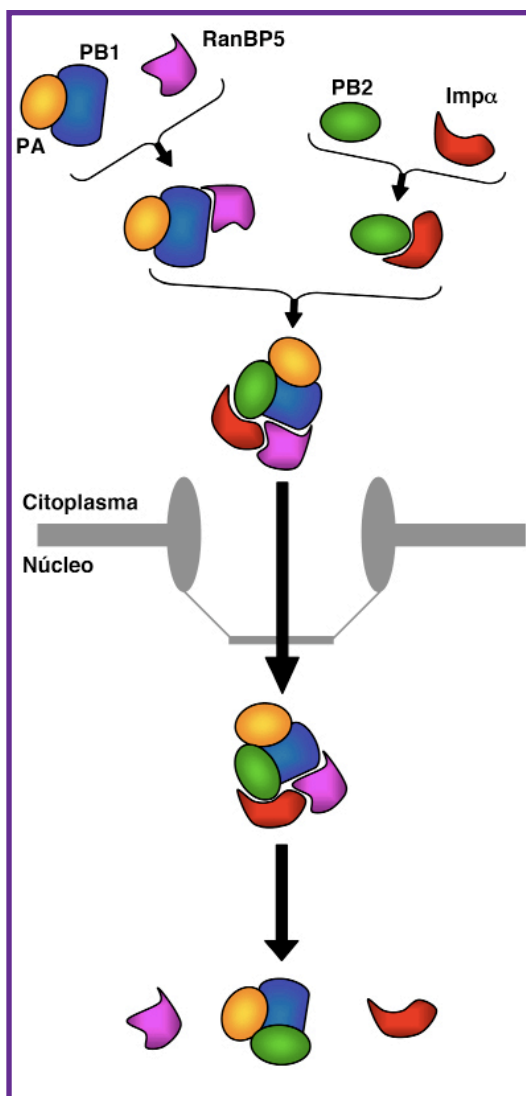


Figura D1. Modelo de la formación del complejo de la RNA polimerasa del virus de la gripe y su importación nuclear. En el ciclo clásico de importación nuclear de la célula no infectada, las importinas β son un factor de transporte que lleva proteínas a través del poro nuclear y las importinas α son un adaptador que se une a la NLS de la proteína a transportar y la conecta con la importina β . En la infección, el heterodímero PB1/PA se formaría en el citoplasma e interaccionaría con la importina β RanBP5. Por otro lado, PB2 interaccionaría con importina α . La formación del complejo de polimerasa se produciría en el citoplasma en parte mediado por la interacción entre la importina α y la β . La disociación del complejo pentamérico tendría lugar en el núcleo por la unión de RanGTP a la importina β .

3. Profundizando en el ciclo viral: Una perspectiva estructural de la replicación del RNA viral

Cuando la polimerasa ha llegado al núcleo (Fig. In7-7), debe acomplejarse con el nuevo RNA viral que se está sintetizando mediante el proceso de replicación. Durante el ciclo infectivo, a este RNA se asociará además NP, conformando las RNPs virales progenie. Como se ha explicado anteriormente, la replicación tiene lugar en dos pasos: primero se producen las cRNPs (Fig. 7-8) y después estas cRNPs dan lugar a muchas copias de nuevas vRNPs (Fig. 7-9). En contraste con la transcripción, la replicación del RNA viral implica la iniciación *de novo* (Hay et al, 1982) y ocurre vía intermedios de replicación que son copias completas complementarias del molde (Elton et al, 2005). Aunque el conocimiento de la replicación y transcripción del RNA viral ha progresado en los últimos años, aún se consideran diversas alternativas como mecanismos potenciales para explicar las diferencias funcionales entre la replicación y la transcripción del RNA del virus (Elton et al, 2005; Neumann et al, 2004; Ortín, 2008). Recientemente se han publicado experimentos genéticos que dan soporte a un modelo en *trans* para la replicación del RNA, pero no para la transcripción (Jorba et al, 2009) (Fig. In14). En la primera parte de Resultados de esta Memoria se han analizado estructural y funcionalmente complejos polimerasa-RNA que son intermedios o productos de la replicación *in vivo*, dando una visión estructural al modelo recientemente publicado.

3.1. La interacción con el RNA viral impide la oligomerización de la RNA polimerasa de gripe

Los intentos de mejora de la expresión y purificación del complejo de la RNA polimerasa

de gripe para estudios estructurales nos llevaron a preparaciones de rendimiento y pureza adecuados, pero la polimerasa purificada mostraba un peso molecular aparente correspondiente al de agregados de proteínas en el rango del MDa (**Fig. R3**). Dado que RNPs recombinantes purificadas de forma similar se comportaban como monómeros en ensayos de cromatografía de exclusión molecular (Coloma et al, 2009), se podría pensar que la interacción de la polimerasa con el RNA molde y/o la NP eliminaría su capacidad de oligomerizar. De hecho, cuando la polimerasa se co-expresó *in vivo* con un molde vRNA corto, se pudo optimizar la purificación de los complejos polimerasa-vRNA que no oligomerizan y se estudiaron estructuralmente (**Fig. R4-6**). Sorprendentemente, también fueron detectadas estructuras diméricas, tanto bioquímicamente (**Fig. R6B**) como mediante análisis de imagen (**Fig. R7, R16**).

Estos resultados sugieren que la simple interacción de la polimerasa con el vRNA molde es suficiente para generar un complejo que emule el complejo polimerasa-promotor en la estructura de la RNP. De hecho, la estructura tridimensional obtenida para estos complejos monoméricos es similar a la estructura de crio-ME de la polimerasa asociada a la RNP previamente publicada (Coloma et al, 2009) (**Fig. R10**), aunque la resolución obtenida ahora es menor (25 Å). Además, el análisis bidimensional de la imágenes y la comparación de las medias 2D de las imágenes con las proyecciones del modelo de crio-ME denotan de manera fiable la presencia de una densidad adicional que podría representar el RNA molde no cubierto por el complejo de la polimerasa (**Fig. R8**). La longitud de este RNA desnudo sería de 20 nt aproximadamente, que correspondería a unos 70 Å, lo cual es compatible con las dimensiones de la densidad extra observada.

3.2. Los complejos polimerasa-vRNA purificados son producto de la replicación *in vivo*

La generación de complejos polimerasa-vRNA usando una polimerasa con una mutación letal en PB1 fue inviable. El material purificado era indistinguible de las preparaciones de polimerasa oligomerizada (**Fig. R12**). Estos resultados sugieren fuertemente que la formación de complejos polimerasa-vRNA *in vivo* es el resultado de la replicación de algunos moldes iniciales proporcionados por la transcripción del plásmido genómico (pHHvRNA) por la RNA polimerasa I celular y que no representan la formación directa de complejo de la polimerasa y el molde RNA proveniente del plásmido. En otras palabras, que los complejos polimerasa-vRNA obtenidos podrían considerarse como “progenie” del molde dado o “micro-RNPs” sin NP. Esto sería factible dado que se ha demostrado que el complejo de polimerasa es capaz de replicar *in vitro* RNAs molde cortos en ausencia de NP (Honda et al, 1988; Newcomb et al, 2009) y daría relevancia a la estructura descrita (**Fig. R9**).

Partiendo de esta propuesta, también debería formarse *in vivo* un complejo polimerasa-cRNA. De hecho, una pequeña fracción de los complejos polimerasa-vRNA purificados contienen cRNA (**Fig. R5B**). Además, cuando la polimerasa se co-expresó *in vivo* con un molde corto de cRNA (mediante la co-transfección del plásmido pHHcRNA), se obtuvieron complejos de polimerasa similares a los obtenidos al proporcionar vRNA (**Fig. R14-15**). Así, sólo se pudo purificar una mezcla de complejos polimerasa-RNA monoméricos y diméricos cuando se incluyó una subunidad de PB1 silvestre, pero no cuando se usó el mutante de PB1 D445E (**Fig. R15**). Aún más relevante es que el RNA viral mayoritario asociado a estos complejos polimerasa-RNA sea vRNA (**Fig.**

R15B), lo cual implica que estos complejos son productos finales de la replicación *in vivo*.

Los resultados obtenidos en ensayos de transcripción *in vitro* con los complejos purificados de polimerasa-vRNA (Fig. R13) también encajan con que estos complejos sean productos e intermedios de la replicación *in vivo*. Así, la mayor parte del RNA sintetizado *in vitro* en ausencia de iniciador, o usando ApG como iniciador, fue un producto truncado de 36 nt que podría corresponder a un transcrito incompleto iniciado *de novo*, o con ApG, y terminado prematuramente debido al impedimento estérico de la polimerasa residente. Este producto no está

poliadenilado porque el molde carece de señal de poliadenilación, y podría interpretarse como el resultado de la transcripción en *cis* de los complejos monoméricos más abundantes (Jorba et al, 2009). Sólo una pequeña fracción de los transcritos *in vitro* corresponden a copias completas del molde y podrían corresponder a la replicación en *trans* llevada a cabo por los complejos diméricos (Jorba et al, 2009). Cuando se inicia la reacción *in vitro* con mRNA de β globina se observa una fuerte estimulación de la generación transcritos incompletos, en este caso con un tramo adicional correspondiente al iniciador derivado del mRNA de β globina, y sólo se detecta una débil banda artefactual correspondiente al producto de longitud

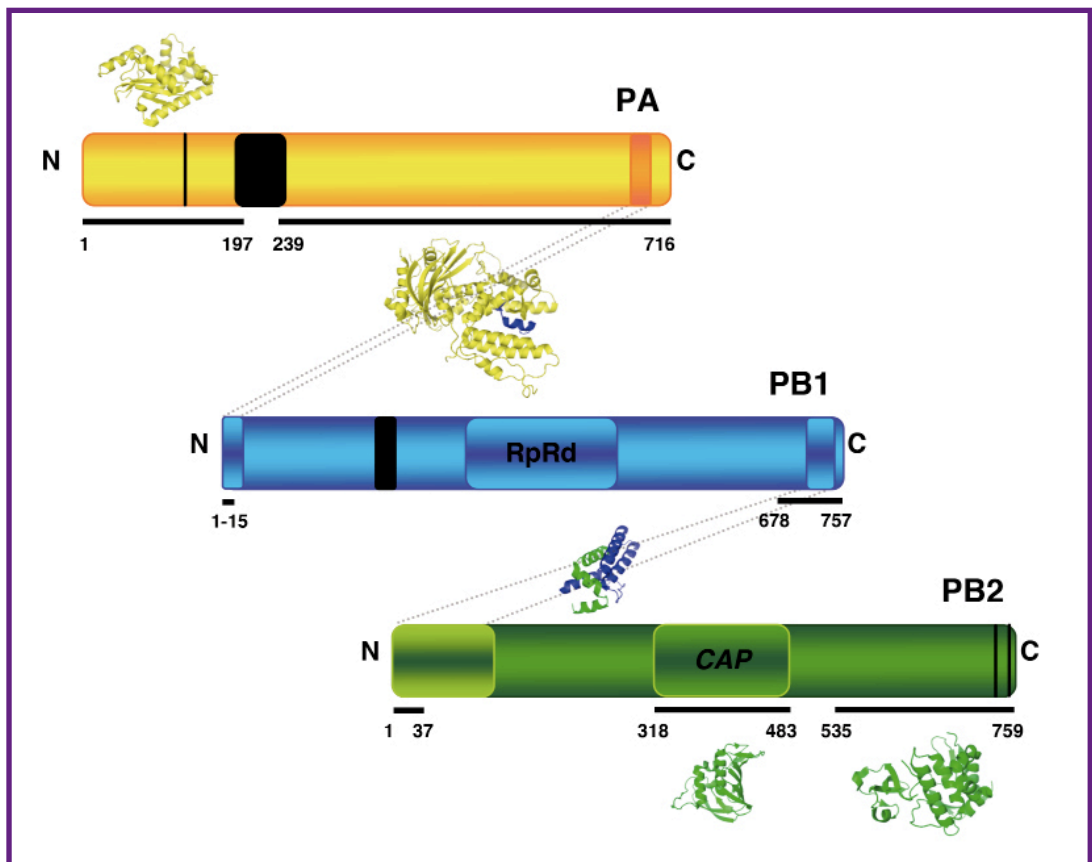


Figura D2. Diagrama de las regiones de la polimerasa con estructura atómica conocida. Se representan las tres subunidades de la polimerasa viral (PA, PB1 y PB2) y los sitios de interacción entre ellas cristalizados (líneas discontinuas). En negro se representan las señales de localización nuclear (NLS) descritas. Las regiones con estructura atómica descrita se indican bajo cada subunidad mediante una línea negra, así como el número de residuo de cada extremo.

completa con el *cap*. Esto sugiere que los complejos polimerasa-vRNA monoméricos son diana de la estimulación por *cap-snatching* mientras que los diméricos lo son en mucha menor proporción.

3.3. Estructura de la polimerasa del virus de la gripe

La resolución del modelo del complejo polimerasa-vRNA obtenido en esta Tesis ha sido de 25 Å, inferior al que se consiguió para la polimerasa de la RNP por crio-ME (18 Å) (Coloma et al, 2009). A pesar de que se incrementó el número de imágenes de los monómeros hasta casi el doble, la resolución no mejoró, lo cual sería un indicio de que la muestra purificada no es completamente uniforme. De hecho, el análisis bioquímico del RNA asociado a esta polimerasa mostró que había una mezcla de RNA de ambas polaridades, aunque mayoritariamente fuera vRNA (**Fig. R5**). Esto podría indicar que la interacción del complejo de polimerasa a un tipo de RNA u otro provocaría un cambio de conformación en el complejo de la polimerasa suficiente para que los volúmenes sean distintos, lo cual estaría de acuerdo con que la polimerasa utilice distintas estrategias de iniciación según el promotor que tenga unido, vRNA o cRNA (Deng et al, 2006b).

Como se ha mencionado previamente, hasta el momento no se ha resuelto la estructura del complejo de la polimerasa a nivel atómico, aunque se han resuelto las estructuras atómicas de dominios específicos de la polimerasa, cubriendo la mayoría de la subunidad PA (Dias et al, 2009; He et al, 2008; Obayashi et al, 2008; Yuan et al, 2009), una gran fracción de la subunidad PB2 (Guilligay et al, 2008; Kuzuhara et al, 2009; Tarendeau et al, 2007; Tarendeau et al, 2008) y los pequeños sitios de conexión de PB1 con las otras subunidades (He et al,

2008; Obayashi et al, 2008; Sugiyama et al, 2009). Lamentablemente el tamaño de estos fragmentos no es lo suficientemente grande para poder hacer un *docking* en el volumen de la polimerasa resuelto por microscopía electrónica (**Fig. D2**).

3.4. Una visión estructural del modelo *trans/cis* para la replicación/transcripción del RNA de gripe

Los resultados de los experimentos genéticos de trans-complementación llevaron recientemente a la propuesta de nuevos modelos para la replicación y transcripción del RNA viral de gripe (Jorba et al, 2009). De acuerdo a estos datos, la replicación del RNA viral tendría lugar en *trans*, es decir, que sería llevado a cabo por un complejo de polimerasa distinto del presente en la RNP paterna. Además, el complejo de polimerasa incorporado a la RNP progenie sería también distinto tanto de la polimerasa presente en la RNP paterna como de la responsable de la polimerización. Datos bioquímicos previos respaldan las potenciales interacciones polimerasa-polimerasa que tendrían un papel en el proceso de replicación en *trans* (Huet et al, 2009; Jorba et al, 2008a). Así, la expresión del complejo de polimerasa recombinante en células humanas proporciona evidencias de la formación de agregados con masa molecular aparente en el rango del MDa.

Los resultados bioquímicos, estructurales y funcionales presentados en esta Memoria permiten dar una visión estructural a este modelo de replicación en *trans*. Como se mencionó previamente, los complejos polimerasa-vRNA purificados de células humanas representan probablemente el resultado final de la replicación (complejos monoméricos) y se propone que los complejos diméricos detectados (**Fig. R7A**) y analizados estructuralmente (**Fig. R16B-D**)

representen intermedios en el proceso de replicación. Estos dímeros ayudarían a visualizar los distintos estadios propuestos previamente y pueden ser discutidos en términos del siguiente modelo (Fig. D3).

Como se propuso previamente (Jorba et al, 2009), un complejo polimerasa-cRNA intracelular (Fig. D3-1) se activaría por interacción con un complejo de polimerasa independiente (Fig. D3-2) que ganaría acceso al extremo 3' del molde (Fig. D3-3). La polimerasa que replica copiaría el molde, mientras la polimerasa residente permanecería unida al extremo 5' del molde (Fig. D3-4). Una vez el extremo 5' del RNA de nueva síntesis se vuelva accesible, un complejo de polimerasa adicional reconocería específicamente esta secuencia conservada (Fig. D3-5). Como la longitud del RNA molde es corta, es posible que el reconocimiento del RNA progenie por la nueva polimerasa coincida con el desplazamiento de la polimerasa residente

por el complejo de replicación (Fig. D3-6). Finalmente, se formarían dos nuevos complejos de polimerasa-RNA, el complejo progenie (Fig. D3-7) y un complejo paterno modificado, en el que el molde estaría ahora asociado a una polimerasa distinta de la original (Fig. D3-8), que podría entrar en un nuevo ciclo de replicación. Las estructuras incluidas en los cuadrados, particularmente las estructuras representadas en Fig. D3-7, corresponderían a las clases monoméricas de los complejos polimerasa-vRNA purificados y analizados en esta Tesis, mientras que aquellas estructuras incluidas en los círculos corresponderían a los complejos diméricos. La mayoría de ellos serían los dímeros holgados y mostrarían gran variedad de distancias entre los monómeros, dependiendo de la extensión de la replicación del molde. Los dímeros estrictos deberían ser resistentes al tratamiento de RNasa y ser estructuralmente únicos. De hecho, una pequeña fracción de los complejos diméricos es resistente a RNasa

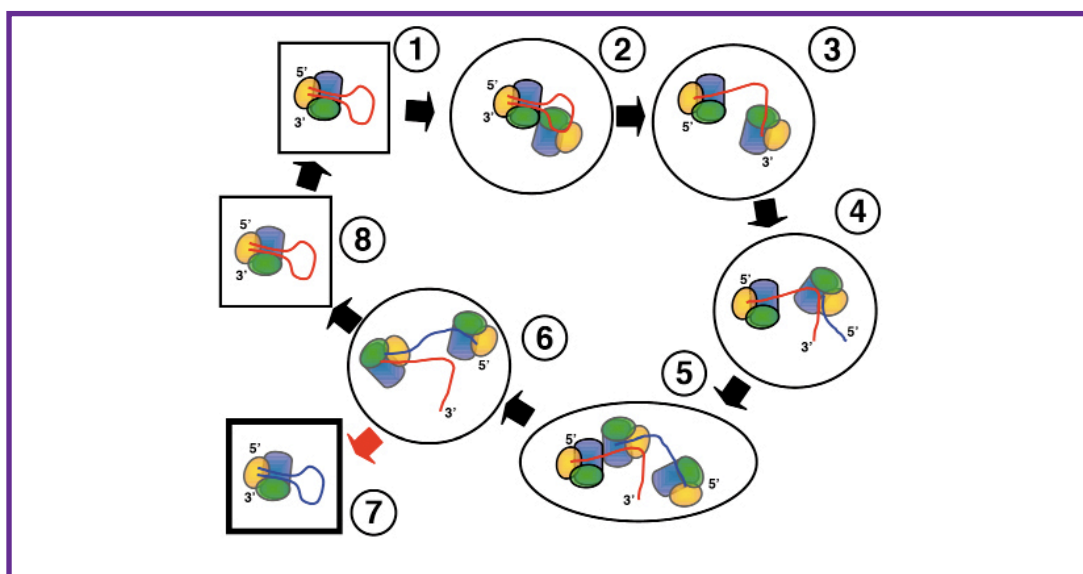


Figura D3. Modelo hipotético para la replicación de los complejos polimerasa-vRNA. Se presentan diversos pasos del proceso de replicación. La polaridad de los moldes está codificada por colores (rojo: polaridad positiva; azul: polaridad negativa). El complejo de polimerasa paterna se indica en colores sólidos mientras que los colores semitransparentes indican un complejo de polimerasa que no estaba asociado al molde previamente. Los cuadrados indican complejos de polimerasa-vRNA monoméricos y los círculos muestran complejos diméricos, la mayoría de los cuales son holgados. La elipse enmarca un potencial complejo trimérico.

(Fig. R11) y algunas de las clases diméricas presentadas en Fig. R16C muestran un contacto íntimo entre los monómeros de la polimerasa y detalles estructurales únicos al promediarse, indicativos de la interacción específica. Desafortunadamente, el número de imágenes en estas clases fue demasiado pequeño para permitir la reconstrucción tridimensional y la comparación con la estructura de los complejos de polimerasa-vRNA monoméricos.

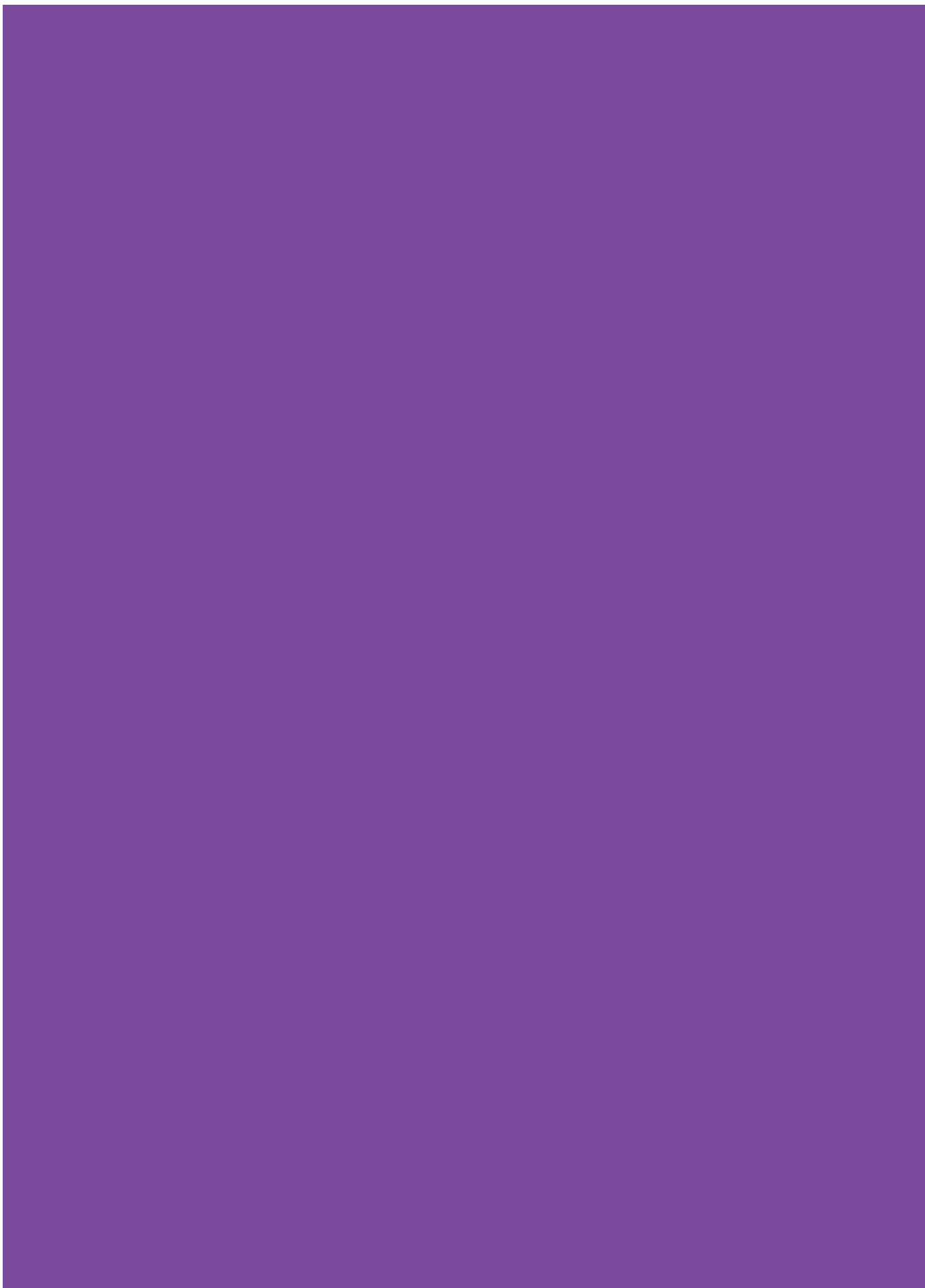


CONCLUSIONES

Science never solves a problem
without creating ten more.

George Bernard Shaw

1. La interacción del complejo de polimerasa con el RNA viral evita su agregación y permite su análisis estructural.
2. Los complejos polimerasa-RNA monoméricos y diméricos analizados estructural y funcionalmente son intermedios o productos de la replicación *in vivo* del RNA viral.
3. La estructura del complejo polimerasa-RNA determinada es análoga a la de la polimerasa incluida en la RNP, lo que sugiere que la unión de la polimerasa al RNA molde es suficiente para cambiar la conformación del complejo libre de RNA.
4. El dominio mínimo de unión a *cap* de PB2 forma un “sándwich aromático” de características similares al bolsillo de unión a *cap* caracterizado en otras proteínas, aunque la topología del plegamiento es novedosa.
5. El sitio de unión a *cap* identificado en la subunidad PB2 es responsable del inicio de la transcripción del RNA viral.
6. Mutaciones en la señal de localización celular de la subunidad PB2, que interacciona con importina α , afectan más fuertemente a la replicación del RNA viral que al transporte de PB2 al núcleo.
7. Se propone un nuevo modelo de formación de complejo de polimerasa que tendría lugar en el citoplasma celular y se transportaría al núcleo mediante la acción de las importinas α y β que interaccionan con las subunidades PB2 y PB1, respectivamente.



BIBLIOGRAFÍA

Lo bueno de tener mala
memoria es que puedes
disfrutar de las cosas
muchas veces.

1. Ali A, Avalos RT, Ponimaskin E, Nayak DP (2000) Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *J Virol* **74**(18): 8709-8719
2. Almond JW (1977) A single gene determines the host range of influenza virus. *Nature* **270**(5638): 617-618
3. Area E, Martín-Benito J, Gastaminza P, Torreira E, Valpuesta JM, Carrascosa JL, Ortín J (2004) Three-dimensional structure of the influenza virus RNA polymerase: localization of subunit domains. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 308-313
4. Arias-Palomo E (2008) Análisis estructural de proteínas reguladoras de GTPasas de la superfamilia Ras mediante microscopía electrónica. *Tesis Doctoral*
5. Avalos RT, Yu Z, Nayak DP (1997) Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells. *J Virol* **71**(4): 2947-2958
6. Bae SH, Cheong HK, Lee JH, Cheong C, Kainosho M, Choi BS (2001) Structural features of an influenza virus promoter and their implications for viral RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(19): 10602-10607
7. Bárcena J, Ochoa M, de la Luna S, Melero JA, Nieto A, Ortín J, Portela A (1994) Monoclonal antibodies against influenza virus PB2 and NP polypeptides interfere with the initiation step of viral mRNA synthesis in vitro. *J Virol* **68**(11): 6900-6909
8. Barrett T, Wolstenholme AJ, Mahy BW (1979) Transcription and replication of influenza virus RNA. *Virology* **98**: 211-225
9. Baudin F, Bach C, Cusack S, Ruigrok RW (1994) Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *Embo J* **13**(13): 3158-3165
10. Bauer CM, Pinto LH, Cross TA, Lamb RA (1999) The influenza virus M2 ion channel protein: probing the structure of the transmembrane domain in intact cells by using engineered disulfide cross-linking. *Virology* **254**(1): 196-209
11. Beaton AR, Krug RM (1986) Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(17): 6282-6286
12. Biswas SK, Boutz PL, Nayak DP (1998) Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J Virol* **72**(7): 5493-5501
13. Biswas SK, Nayak DP (1994) Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *J Virol* **68**: 1819-1826
14. Biswas SK, Nayak DP (1996) Influenza virus polymerase basic protein 1 interacts with influenza virus polymerase basic protein 2 at multiple sites. *J Virol* **70**(10): 6716-6722
15. Blaas D, Patzelt E, Keuchler E (1982) Identification of the cap binding protein of influenza virus. *Nucl Acids Res* **10**: 4803-4812
16. Bozzola J (1992) Electron microscopy: principles and techniques for Biologists.
17. Braam J, Ulmanen I, Krug RM (1983) Molecular model of a eucaryotic transcription complex: functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription. *Cell* **34**(2): 609-618
18. Brownlee GG, Sharps JL (2002) The RNA polymerase of influenza A virus is stabilized by interaction with its viral RNA promoter. *J Virol* **76**(14): 7103-7113
19. Burgess SA, Walker ML, Thirumurugan K, Trinick J, Knight PJ (2004) Use of negative stain and single-particle image processing to explore dynamic properties of flexible macromolecules. *J Struct Biol* **147**(3): 247-258
20. Burgui I, Aragón T, Ortín J, Nieto A (2003) PABP1 and eIF4GI associate to influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J Gen Virol* **84**: 3263-3274
21. Calero G, Wilson KF, Ly T, Rios-Steiner JL, Clardy JC, Cerione RA (2002) Structural basis of m7GpppG binding to the nuclear cap-binding protein complex. *Nat Struct Biol* **9**(12): 912-917
22. Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Bennink JR, Yewdell JW (2001) A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* **7**(12): 1306-1312
23. Cianci C, Colonno RJ, Krystal M (1997) Differential effect of modified capped RNA substrates on influenza virus transcription. *Virus Res* **50**(1): 65-75
24. Colman PM, Varghese JN, Laver WG (1983) Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* **303**(5912): 41-44
25. Coloma R (2009) Análisis funcional y estructural de la RNP recombinante del virus de la gripe. *Tesis Doctoral*
26. Coloma R, Valpuesta JM, Arranz R, Carrascosa JL, Ortín J, Martín-Benito J (2009) The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex. *PLoS Pathog* **5**(6): e1000491
27. Compans RW, Content J, Duesberg PH (1972) Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Virol* **4**: 795-800
28. Condit R (2007) Principles of virology. In *Fields Virology 5th edition*, Knipe DM, Howley PM (eds), Vol. 1, 2, pp 25-57. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins
29. Cros JF, Palese P (2003) Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Bornavirus. *Virus Res* **95**(1-2): 3-12
30. De Clercq E (2006) Antiviral agents active against

influenza A viruses. *Nat Rev Drug Discov* **5**(12): 1015-1025

31. de la Luna S, Martín J, Portela A, Ortín J (1993) Influenza virus naked RNA can be expressed upon transfection into cells co-expressing the three subunits of the polymerase and the nucleoprotein from SV40 recombinant viruses. *J Gen Virol* **74**: 535-539

32. Deng T, Engelhardt OG, Thomas B, Akoulitchiev AV, Brownlee GG, Fodor E (2006a) The role of Ran Binding Protein 5 (RanBP5) in the nuclear import and assembly of the influenza virus RNA polymerase complex. *J Virol* **80**(24): 11911-11919

33. Deng T, Sharps J, Fodor E, Brownlee GG (2005) In vitro assembly of PB2 with a PB1-PA dimer supports a new model of assembly of influenza A virus polymerase subunits into a functional trimeric complex. *J Virol* **79**(13): 8669-8674

34. Deng T, Vreede FT, Brownlee GG (2006b) Different de novo initiation strategies are used by influenza virus RNA polymerase on its cRNA and viral RNA promoters during viral RNA replication. *J Virol* **80**(5): 2337-2348

35. Desselberger U, Raccaniello VR, Zazra JJ, Palese P (1980) The 3' and 5'-end terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity. *Gene* **8**: 315-328

36. Detjen BM, St Angelo C, Katze MG, Krug RM (1987) The three influenza virus polymerase (P) proteins not associated with viral nucleocapsids in the infected cell are in the form of a complex. *J Virol* **61**(1): 16-22

37. Dias A, Bouvier D, Crepin T, McCarthy AA, Hart DJ, Baudin F, Cusack S, Ruigrok RW (2009) The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* **458**(7240): 914-918

38. Digard P, Blok VC, Inglis SC (1989) Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes. *Virology* **171**(1): 162-169

39. Digard P, Elton D, Bishop K, Medcalf E, Weeds A, Pope B (1999) Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments. *J Virol* **73**(3): 2222-2231

40. Dubochet J, Adrian M, Chang JJ, Homo JC, Lepault J, McDowell AW, Schultz P (1988) Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys* **21**(2): 129-228

41. DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP (1987) Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* **7**: 379-387

42. Elton D, Digard P, Tiley L, Ortín J (2005) Structure and function of the influenza virus RNP. In *Current Topics in Influenza Virology*, Kawaoka Y (ed), pp 1-92. Norfolk: Horizon Scientific Press

43. Elton D, Simpson HM, Archer K, Medcalf L, Hallam R, McCauley J, Digard P (2001) Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol* **75**(1): 408-419

44. Engelhardt OG, Sirma H, Pandolfi PP, Haller O (2004) Mx1 GTPase accumulates in distinct nuclear domains and inhibits influenza A virus in cells that lack promyelocytic leukaemia protein nuclear bodies. *J Gen Virol* **85**(Pt 8): 2315-2326

45. Engelhardt OG, Smith M, Fodor E (2005) Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J Virol* **79**(9): 5812-5818

46. Falcón AM, Marión RM, Zürcher T, Gómez P, Portela A, Nieto A, Ortín J (2004) Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive (A/Victoria/3/75) influenza viruses expressing deleted forms of NS1 protein. *J Virol* **78**: 3880-3888

47. Fechter P, Brownlee GG (2005) Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins. *J Gen Virol* **86**(Pt 5): 1239-1249

48. Fechter P, Mingay L, Sharps J, Chambers A, Fodor E, Brownlee GG (2003) Two aromatic residues in the PB2 subunit of influenza A RNA polymerase are crucial for cap binding. *J Biol Chem* **278**(22): 20381-20388

49. Finkelstein DB, Mukatira S, Mehta PK, Obenauer JC, Su X, Webster RG, Naeye CW (2007) Persistent host markers in pandemic and H5N1 influenza viruses. *J Virol* **81**(19): 10292-10299

50. Flick R, Hobom G (1999) Interaction of influenza virus polymerase with viral RNA in the 'corkscrew' conformation. *J Gen Virol* **80** (Pt 10): 2565-2572

51. Flick R, Neumann G, Hoffmann E, Neumeier E, Hobom G (1996) Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure. *Rna* **2**(10): 1046-1057

52. Fodor E, Crow M, Mingay LJ, Deng T, Sharps J, Fechter P, Brownlee GG (2002) A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs. *J Virol* **76**: 8989-9001

53. Fodor E, Mingay LJ, Crow M, Deng T, Brownlee GG (2003) A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase promotes the generation of defective interfering RNAs. *J Virol* **77**(8): 5017-5020

54. Fodor E, Pritlove DC, Brownlee GG (1994) The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. *J Virol* **68**(6): 4092-4096

55. Fodor E, Pritlove DC, Brownlee GG (1995) Characterization of the RNA-fork model of virion RNA in the initiation of transcription in influenza A virus. *J Virol* **69**: 4012-4019

56. Fodor E, Seong BL, Brownlee GG (1993) Photochemical cross-linking of influenza A polymerase to its virion RNA promoter defines a polymerase binding site at residues 9 to 12 of the promoter. *J Gen Virol* **74**: 1327-1333

57. Fodor E, Smith M (2004) The PA subunit is required for efficient nuclear accumulation of the PB1 subunit of the

influenza A virus RNA polymerase complex. *J Virol* **78**(17): 9144-9153

58. Frank J (2006) Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies *New York, Oxford University Press*

59. Frank J, Radermacher M, Penczek P, Zhu J, Li Y, Ladjadj M, Leith A (1996) Spider and web: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J Struct Biol* **116**: 190-199

60. Fuerst TR, Earl PL, Moss B (1987) Use of a hybrid vaccinia virus-T7 RNA polymerase system for expression of target genes. *Mol Cell Biol* **7**: 2538-2544

61. Fujii K, Fujii Y, Noda T, Muramoto Y, Watanabe T, Takada A, Goto H, Horimoto T, Kawaoka Y (2005) Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. *J Virol* **79**(6): 3766-3774

62. Fujii Y, Goto H, Watanabe T, Yoshida T, Kawaoka Y (2003) Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(4): 2002-2007

63. Gabriel G, Dauber B, Wolff T, Planz O, Klenk HD, Stech J (2005) The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 18590-18595

64. Gabriel G, Herwig A, Klenk HD (2008) Interaction of Polymerase Subunit PB2 and NP with Importin alpha1 Is a Determinant of Host Range of Influenza A Virus. *PLoS Pathog* **4**(2): e11

65. Garcia-Robles I, Akarsu H, Muller CW, Ruigrok RW, Baudin F (2005) Interaction of influenza virus proteins with nucleosomes. *Virology* **332**(1): 329-336

66. Garfinkel MS, Katze MG (1992) Translational control by influenza virus. Selective and cap-dependent translation of viral mRNAs in infected cells. *J Biol Chem* **267**: 9383-9390

67. Gastaminza P, Perales B, Falcón AM, Ortín J (2003) Influenza virus mutants in the N-terminal region of PB2 protein are affected in virus RNA replication but not transcription. *J Virol* **76**: 5098-5108

68. Gibbs JS, Malide D, Hornung F, Bennink JR, Yewdell JW (2003) The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. *J Virol* **77**(13): 7214-7224

69. Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ (2001a) Recombination in the hemagglutinin gene of the 1918 "Spanish flu". *Science* **293**(5536): 1842-1845

70. Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ (2001b) The haemagglutinin gene, but not the neuraminidase gene, of 'Spanish flu' was a recombinant. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**(1416): 1845-1855

71. Gomez-Puertas P, Albo C, Perez-Pastrana E, Vivo A,

Portela A (2000) Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J Virol* **74**(24): 11538-11547

72. Gomez-Puertas P, Mena I, Castillo M, Vivo A, Perez-Pastrana E, Portela A (1999) Efficient formation of influenza virus-like particles: dependence on the expression levels of viral proteins. *J Gen Virol* **80**: 1635-1645

73. González S, Ortín J (1999a) Characterization of the influenza virus PB1 protein binding to vRNA: Two separate regions of the protein contribute to the interaction domain. *J Virol* **73**: 631-637

74. González S, Ortín J (1999b) Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates. *EMBO J* **18**: 3767-3775

75. Guilligay D, Tarendeau F, Resa-Infante P, Coloma R, Crepin T, Sehr P, Lewis J, Ruigrok RW, Ortín J, Hart DJ, Cusack S (2008) The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nat Struct Mol Biol* **15**(5): 500-506

76. Hagen M, Tiley L, Chung TD, Krystal M (1995) The role of template-primer interactions in cleavage and initiation by the influenza virus polymerase. *J Gen Virol*

77. Hale BG, Randall RE, Ortín J, Jackson D (2008) The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol* **89**(Pt 10): 2359-2376

78. Hara K, Schmidt FI, Crow M, Brownlee GG (2006) Amino acid residues in the N-terminal region of the PA subunit of influenza A virus RNA polymerase play a critical role in protein stability, endonuclease activity, cap binding, and virion RNA promoter binding. *J Virol* **80**(16): 7789-7798

79. Harauz G, Ottensmeyer FP (1984) Nucleosome reconstruction via phosphorus mapping. *Science* **226**(4677): 936-940

80. Hatta M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y (2001) Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* **293**(5536): 1840-1842

81. Hay AJ, Lomniczi B, Bellamy AR, Skehel JJ (1977) Transcription of the influenza virus genome. *Virology* **83**: 337-355

82. Hay AJ, Skehel JJ, McCauley J (1982) Characterization of influenza virus RNA complete transcripts. *Virology* **116**: 517-522

83. He X, Zhou J, Bartlam M, Zhang R, Ma J, Lou Z, Li X, Li J, Joachimiak A, Zeng Z, Ge R, Rao Z, Liu Y (2008) Crystal structure of the polymerase PA(C)-PB1(N) complex from an avian influenza H5N1 virus. *Nature* **454**(7208): 1123-1126

84. Helenius A (1992) Unpacking the incoming influenza virus. *Cell* **69**: 577-578

85. Hemerka JN, Wang D, Weng Y, Lu W, Kaushik RS, Jin J, Harmon AF, Li F (2009) Detection and characterization of influenza A virus PA-PB2 interaction through a bimolecular fluorescence complementation assay. *J Virol* **83**(8): 3944-3955

86. Heymann JB (2001) Bsoft: image and molecular processing in electron microscopy. *J Struct Biol* **133**(2-3): 156-169
87. Hirayama E, Atagi H, Hiraki A, Kim J (2004) Heat shock protein 70 is related to thermal inhibition of nuclear export of the influenza virus ribonucleoprotein complex. *J Virol* **78**(3): 1263-1270
88. Hobson SD, Rosenblum ES, Richards OC, Richmond K, Kirkegaard K, Schultz SC (2001) Oligomeric structures of poliovirus polymerase are important for function. *Embo J* **20**(5): 1153-1163
89. Hodel AE, Gershon PD, Quijcho FA (1998) Structural basis for sequence-nonspecific recognition of 5'-capped mRNA by a cap-modifying enzyme. *Mol Cell* **1**(3): 443-447
90. Holm L, Sander C (1993) Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J Mol Biol* **233**(1): 123-138
91. Holsinger LJ, Lamb RA (1991) Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology* **183**(1): 32-43
92. Honda A, Mizumoto K, Ishihama A (1999) Two separate sequences of PB2 subunit constitute the RNA cap-binding site of influenza virus RNA polymerase. *Genes Cells* **4**(8): 475-485
93. Honda A, Mukaigawa J, Yokoiyama A, Kato A, Ueda S, Nagata K, Krystal M, Nayak DP, Ishihama A (1990) Purification and molecular structure of RNA polymerase from influenza virus A/PR8. *J Biochem Tokyo* **107**(4): 624-628
94. Honda A, Okamoto T, Ishihama A (2007) Host factor Ebp1: selective inhibitor of influenza virus transcriptase. *Genes Cells* **12**(2): 133-142
95. Honda A, Ueda K, Nagata K, Ishihama A (1987) Identification of the RNA polymerase-binding site on genome RNA of influenza virus. *J Biochem Tokyo* **102**(5): 1241-1249
96. Honda A, Ueda K, Nagata K, Ishihama A (1988) RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. *J Biochem (Tokyo)* **104**(6): 1021-1026
97. Hooker L, Sully R, Handa B, Ono N, Koyano H, Klumpp K (2003) Quantitative analysis of influenza virus RNP interaction with RNA cap structures and comparison to human cap binding protein eIF4E. *Biochemistry* **42**(20): 6234-6240
98. Hsu MT, Parvin JD, Gupta S, Krystal M, Palese P (1987) Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(22): 8140-8144
99. Huang TS, Palese P, Krystal M (1990) Determination of influenza virus proteins required for genome replication. *J Virol* **64**(11): 5669-5673
100. Huarte M, Falcon A, Nakaya Y, Ortin J, Garcia-Sastre A, Nieto A (2003) Threonine 157 of influenza virus PA polymerase subunit modulates RNA replication in infectious viruses. *J Virol* **77**(10): 6007-6013
101. Huarte M, Sanz-Ezquerro JJ, Roncal F, Ortin J, Nieto A (2001) PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. *J Virol* **75**: 8597-8604
102. Huet S, Avilov S, Ferbitz L, Daigle N, Cusack S, Ellenberg J (2009) Nuclear import and assembly of the influenza A virus RNA polymerase studied in live cells by Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy. *J Virol*
103. Hughey PG, Roberts PC, Holsinger LJ, Zebedee SL, Lamb RA, Compans RW (1995) Effects of antibody to the influenza A virus M2 protein on M2 surface expression and virus assembly. *Virology* **212**(2): 411-421
104. Inglis SC, Barret T, Brown CM, Almond JW (1979) The smallest genome RNA segment of influenza virus contains two genes that may overlap. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 3790-3794
105. Inglis SC, Brown CM (1981) Spliced and unspliced RNAs encoded by virion RNA segment 7 of influenza virus. *Nucleic Acid Res* **9**: 2727-2740
106. Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Noda T, Kiso M, Maeda J, Watanabe S, Muramoto Y, Fujii K, Kawaoka Y (2006) The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. *J Virol* **80**(11): 5233-5240
107. Jiang W, Ludtke SJ (2005) Electron cryomicroscopy of single particles at subnanometer resolution. *Curr Opin Struct Biol* **15**(5): 571-577
108. Jorba N (2009) Complejos intracelulares formados por la RNA polimerasa del virus de la gripe: oligomerización, factores asociados y complementación génica. *Tesis Doctoral*
109. Jorba N, Area E, Ortin J (2008a) Oligomerization of the influenza virus polymerase complex in vivo. *J Gen Virol* **89**(Pt 2): 520-524
110. Jorba N, Coloma R, Ortin J (2009) Genetic trans-complementation establishes a new model for influenza virus RNA transcription and replication. *PLoS Pathog* **5**(5): e1000462
111. Jorba N, Juarez S, Torreira E, Gastaminza P, Zamarreno N, Albar JP, Ortin J (2008b) Analysis of the interaction of influenza virus polymerase complex with human cell factors. *Proteomics* **8**(10): 2077-2088
112. Karlas A, Machuy N, Shin Y, Pleissner KP, Artarini A, Heuer D, Becker D, Khalil H, Ogilvie LA, Hess S, Maurer AP, Muller E, Wolff T, Rudel T, Meyer TF (2010) Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature* **463**(7282): 818-822
113. Kastner B, Fischer N, Golas MM, Sander B, Dube P, Boehringer D, Hartmuth K, Deckert J, Hauer F, Wolf E, Uchtenhagen H, Urlaub H, Herzog F, Peters JM, Poerschke D, Luhrmann R, Stark H (2008) GraFix: sample preparation for

single-particle electron cryomicroscopy. *Nat Methods* **5**(1): 53-55

114. Kato A, Mizumoto K, Ishihama A (1985) Purification and enzymatic properties of an RNA polymerase-RNA complex from influenza virus. *Virus Res* **3**(2): 115-127

115. Kawakami K, Mizumoto K, Ishihama A, Shinozaki YK, Miura K (1985) Activation of influenza virus-associated RNA polymerase by cap-1 structure (m7GpppNm). *J Biochem* **97**(2): 655-661

116. Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG (1989) Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* **63**(11): 4603-4608

117. Kerry PS, Willsher N, Fodor E (2008) A cluster of conserved basic amino acids near the C-terminus of the PB1 subunit of the influenza virus RNA polymerase is involved in the regulation of viral transcription. *Virology* **373**(1): 202-210

118. Kilbourne ED (1980) Influenza: viral determinants of the pathogenicity and epidemicity of an invariant disease of variable occurrence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **288**(1029): 291-297

119. Kilbourne ED (2006) Influenza pandemics of the 20th century. *Emerging Infectious Diseases* **12**

120. Kim HJ, Fodor E, Brownlee GG, Seong BL (1997) Mutational analysis of the RNA-fork model of the influenza A virus vRNA promoter in vivo. *J Gen Virol* **78** (Pt 2): 353-357

121. Klumpp K, Ruigrok RW, Baudin F (1997) Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *Embo J* **16**(6): 1248-1257

122. Kobayashi M, Toyoda T, Ishihama A (1996) Influenza virus PB1 protein is the minimal and essential subunit of RNA polymerase. *Arch Virol* **141**: 525-539

123. Konig R, Stertz S, Zhou Y, Inoue A, Hoffmann HH, Bhattacharyya S, Alamares JG, Tscherne DM, Ortigoza MB, Liang Y, Gao Q, Andrews SE, Bandyopadhyay S, De Jesus P, Tu BP, Pache L, Shih C, Orth A, Bonamy G, Miraglia L, Ideker T, Garcia-Sastre A, Young JA, Palese P, Shaw ML, Chanda SK (2010) Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* **463**(7282): 813-817

124. Krug RM (1989) *The influenza viruses*, New York: Plenum Press.

125. Krug RM, Alonso-Kaplen FV, Julkunen I, Katze MG (1989) Expression and replication of the influenza virus genome. In *The influenza viruses*, Krug RM (ed), pp 89-152. New York: Plenum Press

126. Krug RM, Broni BA, Bouloy M (1979) Are the 5' - ends of influenza viral mRNAs synthesized in vivo donated by host mRNAs? *Cell* **18**: 329-334

127. Kuzuhara T, Kise D, Yoshida H, Horita T, Murazaki Y, Nishimura A, Echigo N, Utsunomiya H, Tsuge H (2009) Structural basis of the influenza A virus RNA polymerase

PB2 RNA-binding domain containing the pathogenicity-determinant lysine 627 residue. *J Biol Chem* **284**(11): 6855-6860

128. Labadie K, Dos Santos Afonso E, Rameix-Welti MA, van der Werf S, Naffakh N (2007) Host-range determinants on the PB2 protein of influenza A viruses control the interaction between the viral polymerase and nucleoprotein in human cells. *Virology* **362**(2): 271-282

129. Lamb RA, Choppin PW (1979) Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(10): 4908-4912

130. Lamb RA, Choppin PW (1983) The gene structure and replication of influenza virus. *Annu Rev Biochem* **52**(467): 467-506

131. Lee MT, Bishop K, Medcalf L, Elton D, Digard P, Tiley L (2002) Definition of the minimal viral components required for the initiation of unprimed RNA synthesis by influenza virus RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **30**(2): 429-438

132. Lee MT, Klumpp K, Digard P, Tiley L (2003) Activation of influenza virus RNA polymerase by the 5' and 3' terminal duplex of genomic RNA. *Nucleic Acids Res* **31**(6): 1624-1632

133. Leschziner AE, Nogales E (2006) The orthogonal tilt reconstruction method: an approach to generating single-class volumes with no missing cone for ab initio reconstruction of asymmetric particles. *J Struct Biol* **153**(3): 284-299

134. Li C, Hatta M, Watanabe S, Neumann G, Kawaoka Y (2008) Compatibility among polymerase subunit proteins is a restricting factor in reassortment between equine H7N7 and human H3N2 influenza viruses. *J Virol* **82**(23): 11880-11888

135. Li ML, Ramirez BC, Krug RM (1998) RNA-dependent activation of primer RNA production by influenza virus polymerase: different regions of the same protein subunit constitute the two required RNA-binding sites. *Embo J* **17**(19): 5844-5852

136. Li ML, Rao P, Krug RM (2001) The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *EMBO Journal* **20**: 2078-2086

137. Li Z, Chen H, Jiao P, Deng G, Tian G, Li Y, Hoffmann E, Webster RG, Matsuoka Y, Yu K (2005) Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model. *J Virol* **79**(18): 12058-12064

138. Liang Y, Hong Y, Parslow TG (2005) cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments. *J Virol* **79**(16): 10348-10355

139. Liang Y, Huang T, Ly H, Parslow TG, Liang Y (2008) Mutational analyses of packaging signals in influenza virus PA, PB1, and PB2 genomic RNA segments. *J Virol* **82**(1): 229-236

140. Llorca O (2005) Introduction to 3D reconstruction of macromolecules using single particle electron microscopy. *Acta Pharmacol Sin* **26**(10): 1153-1164

- 141.** López-Turiso JA, Martínez C, Tanaka T, Ortín J (1990) The synthesis of influenza virus negative-strand RNA takes place in insoluble complexes present in the nuclear matrix fraction. *Virus Res* **16**(3): 325-337
- 142.** Ludtke SJ, Baldwin PR, Chiu W (1999) EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J Struct Biol* **128**(1): 82-97
- 143.** Luo G, Danetz S, Krystal M (1997) Inhibition of influenza viral polymerases by minimal viral RNA decoys. *J Gen Virol* **78** (Pt 9): 2329-2333
- 144.** Luo GX, Luytjes W, Enami M, Palese P (1991) The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure. *J Virol* **65**(6): 2861-2867
- 145.** Lyle JM, Bullitt E, Bienz K, Kirkegaard K (2002) Visualization and functional analysis of RNA-dependent RNA polymerase lattices. *Science* **296**(5576): 2218-2222
- 146.** Ma K, Roy AM, Whittaker GR (2001) Nuclear export of influenza virus ribonucleoproteins: identification of an export intermediate at the nuclear periphery. *Virology* **282**(2): 215-220
- 147.** Mahy BWJ (1983) Mutants of influenza virus. In *Genetics of influenza viruses*, Palese P, Kingsbury DW (eds), pp 192-253. Wien: Springer Verlag
- 148.** Maier HJ, Kashiwagi T, Hara K, Brownlee GG (2008) Differential role of the influenza A virus polymerase PA subunit for vRNA and cRNA promoter binding. *Virology* **370**(1): 194-204
- 149.** Marabini R, Masegosa IM, San Martín C, Marco S, Fernández JJ, de la Fraga LG, Vaquerizo C, Carazo JM (1996) X-mipp: an image processing package for electron microscopy. *J Struct Biol* **116**: 237-240
- 150.** Martin K, Helenius A (1991) Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* **67**(1): 117-130
- 151.** Martín-Benito J, Area E, Ortega J, Llorca O, Valpuesta JM, Carrascosa JL, Ortín J (2001) Three dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle. *EMBO Reports* **2**: 313-317
- 152.** Mayer D, Molawi K, Martínez-Sobrido L, Ghanem A, Thomas S, Baginsky S, Grossmann J, García-Sastre A, Schwemmler M (2007) Identification of Cellular Interaction Partners of the Influenza Virus Ribonucleoprotein Complex and Polymerase Complex Using Proteomic-Based Approaches. *J Proteome Res* **6**(2): 672-682
- 153.** Mazur I, Anhlán D, Mitzner D, Wixler L, Schubert U, Ludwig S (2008) The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell Microbiol* **10**(5): 1140-1152
- 154.** Mazza C, Segref A, Mattaj IW, Cusack S (2002) Large-scale induced fit recognition of an m(7)GpppG cap analogue by the human nuclear cap-binding complex. *Embo J* **21**(20): 5548-5557
- 155.** McAuley JL, Hornung F, Boyd KL, Smith AM, McKeon R, Bennink J, Yewdell JW, McCullers JA (2007) Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell Host Microbe* **2**(4): 240-249
- 156.** McCown MF, Pekosz A (2006) Distinct domains of the influenza A virus M2 protein cytoplasmic tail mediate binding to the M1 protein and facilitate infectious virus production. *J Virol* **80**(16): 8178-8189
- 157.** Medcalf L, Poole E, Elton D, Digard P (1999) Temperature-sensitive lesions in two influenza A viruses defective for replicative transcription disrupt RNA binding by the nucleoprotein. *J Virol* **73**(9): 7349-7356
- 158.** Mena I, de la Luna S, Albo C, Martín J, Nieto A, Ortín J, Portela A (1994) Synthesis of biologically active influenza virus core proteins using a vaccinia-T7 RNA polymerase expression system. *J Gen Virol* **75**: 2109-2114
- 159.** Mena I, Jambrina E, Albo C, Perales B, Ortín J, Arrese M, Vallejo D, Portela A (1999) Mutational analysis of influenza A virus nucleoprotein: identification of mutations that affect RNA replication. *J Virol* **73**: 1186-1194
- 160.** Momose F, Basler CF, O'Neill RE, Iwamatsu A, Palese P, Nagata K (2001) Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. *J Virol* **75**(4): 1899-1908
- 161.** Momose F, Naito T, Yano K, Sugimoto S, Morikawa Y, Nagata K (2002) Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis. *J Biol Chem* **277**(47): 45306-45314
- 162.** Mukaigawa J, Nayak DP (1991) Two signals mediate nuclear localization of influenza virus (A/WSN/33) polymerase basic protein 2. *J Virol* **65**: 245-253
- 163.** Muramoto Y, Takada A, Fujii K, Noda T, Iwatsuki-Horimoto K, Watanabe S, Horimoto T, Kida H, Kawaoka Y (2006) Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J Virol* **80**(5): 2318-2325
- 164.** Naito T, Kiyasu Y, Sugiyama K, Kimura A, Nakano R, Matsukage A, Nagata K (2007a) An influenza virus replicon system in yeast identified Tat-SF1 as a stimulatory host factor for viral RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(46): 18235-18240
- 165.** Naito T, Momose F, Kawaguchi A, Nagata K (2007b) Involvement of Hsp90 in assembly and nuclear import of influenza virus RNA polymerase subunits. *J Virol* **81**(3): 1339-1349
- 166.** Nath ST, Nayak DP (1990) Function of two discrete regions is required for nuclear localization of polymerase basic protein 1 of A/WSN/33 influenza virus (H1N1). *Mol Cell Biol* **10**(8): 4139-4145

- 167.** Nayak DP, Hui EK, Barman S (2004) Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res* **106**(2): 147-165
- 168.** Neumann G, Brownlee GG, Fodor E, Kawaoka Y (2004) Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. *Curr Top Microbiol Immunol* **283**: 121-143
- 169.** Neumann G, Hughes MT, Kawaoka Y (2000) Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *Embo J* **19**(24): 6751-6758
- 170.** Neumann G, Noda T, Kawaoka Y (2009) Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* **459**(7249): 931-939
- 171.** Neumann G, Watanabe T, Ito H, Watanabe S, Goto H, Gao P, Hughes M, Perez DR, Donis R, Hoffmann E, Hobom G, Kawaoka Y (1999) Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16): 9345-9350
- 172.** Newcomb LL, Kuo RL, Ye Q, Jiang Y, Tao YJ, Krug RM (2009) Interaction of the influenza A virus nucleocapsid protein with the viral RNA polymerase potentiates unprimed viral RNA replication. *J Virol* **83**(1): 29-36
- 173.** Nicholls JM, Chan RW, Russell RJ, Air GM, Peiris JS (2008) Evolving complexities of influenza virus and its receptors. *Trends Microbiol* **16**(4): 149-157
- 174.** Niedzwiecka A, Marcotrigiano J, Stepinski J, Jankowska-Anyszka M, Wyslouch-Cieszyńska A, Dadlez M, Gingras AC, Mak P, Darzynkiewicz E, Sonenberg N, Burley SK, Stolarski R (2002) Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins. *J Mol Biol* **319**(3): 615-635
- 175.** Niepmann M, Zheng J (2006) Discontinuous native protein gel electrophoresis. *Electrophoresis* **27**(20): 3949-3951
- 176.** Nieto A, de la Luna S, Bárcena J, Portela A, Ortín J (1994) Complex structure of the nuclear translocation signal of the influenza virus polymerase PA subunit. *J Gen Virol* **75**: 29-36
- 177.** Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida H, Cheng RH, Kawaoka Y (2006) Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* **439**(7075): 490-492
- 178.** Noton SL, Medcalf E, Fisher D, Mullin AE, Elton D, Digard P (2007) Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. *J Gen Virol* **88**(Pt 8): 2280-2290
- 179.** O'Neill RE, Jaskunas R, Blobel G, Palese P, Moroianu J (1995) Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *J Biol Chem* **270**(39): 22701-22704
- 180.** O'Neill RE, Talon J, Palese P (1998) The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *Embo J* **17**(1): 288-296
- 181.** Obayashi E, Yoshida H, Kawai F, Shibayama N, Kawaguchi A, Nagata K, Tame JR, Park SY (2008) The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. *Nature* **454**(7208): 1127-1131
- 182.** Ochoa M, Bárcena J, de la Luna S, Melero JA, Douglas AR, Nieto A, Ortín J, Skehel JJ, Portela A (1995) Epitope mapping of cross-reactive monoclonal antibodies specific for the influenza A virus PA and PB2 polypeptides. *Virus Res* **37**: 305-315
- 183.** Ohi M, Li Y, Cheng Y, Walz T (2004) Negative Staining and Image Classification - Powerful Tools in Modern Electron Microscopy. *Biol Proced Online* **6**: 23-34
- 184.** Ohtsu Y, Honda Y, Sakata Y, Kato H, Toyoda T (2002) Fine mapping of the subunit binding sites of influenza virus RNA polymerase. *Microbiol Immunol* **46**(3): 167-175
- 185.** Ortega J, Martín-Benito J, Zürcher T, Valpuesta JM, Carrascosa JL, Ortín J (2000) Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *J Virol* **74**: 156-163
- 186.** Ortín J (2008) Structure and function of the influenza A virus ribonucleoprotein: Transcription and replication. In *Avian influenza. Monographs in Virology*, Klenk H-D, Matrosovish M, Stech J (eds), Vol. 27, pp 168-186. Basel: Karger
- 187.** Ortín J, Nájera R, López C, Dávila M, Domingo E (1980) Genetic variability of Hong Kong (H3N2) influenza viruses: spontaneous mutations and their location in the viral genome. *Gene* **11**: 319-331
- 188.** Palese P, Shaw M (2007) Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology 5th edition*, Knipe DM, Howley PM (eds), Vol. 2, pp 1647-1689. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins
- 189.** Pascual-Montano A, Donate LE, Valle M, Barcena M, Pascual-Marqui RD, Carazo JM (2001) A novel neural network technique for analysis and classification of EM single-particle images. *J Struct Biol* **133**(2-3): 233-245
- 190.** Penczek PA, Yang C, Frank J, Spahn CM (2006) Estimation of variance in single-particle reconstruction using the bootstrap technique. *J Struct Biol* **154**(2): 168-183
- 191.** Penn CR, Mahy BW (1984) Capped mRNAs may stimulate the influenza virion polymerase by allosteric modulation. *Virus Res* **1**(1): 1-13
- 192.** Perales B, Ortín J (1997) The influenza A virus PB2 polymerase subunit is required for the replication of viral RNA. *J Virol* **71**: 1381-1385
- 193.** Pérez DR, Donis RO (1995) A 48-amino-acid region of influenza A virus PB1 protein is sufficient for complex formation with PA. *J Virol* **69**: 6932-6939

194. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**(13): 1605-1612
195. Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA (1992) Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* **69**: 517-528
196. Plotch SJ, Bouloy M, Ulmanen I, Krug RM (1981) A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell* **23**: 847-858
197. Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N (1989) Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J* **8**(12): 3867-3874
198. Pons MW (1971) Isolation of Influenza virus ribonucleoprotein from infected cells. Demonstration of the presence of negative-stranded RNA in viral RNP. *Virology* **46**: 149-160
199. Poole E, Elton D, Medcalf L, Digard P (2004) Functional domains of the influenza A virus PB2 protein: identification of NP- and PB1-binding sites. *Virology* **321**(1): 120-133
200. Poole EL, Medcalf L, Elton D, Digard P (2007) Evidence that the C-terminal PB2-binding region of the influenza A virus PB1 protein is a discrete alpha-helical domain. *FEBS Lett* **581**(27): 5300-5306
201. Poon LL, Pritlove DC, Sharps J, Brownlee GG (1998) The RNA polymerase of influenza virus, bound to the 5' end of virion RNA, acts in cis to polyadenylate mRNA. *J Virol* **72**: 8214-8219
202. Portela A, Digard P (2002) The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol* **83**(Pt 4): 723-734
203. Portela A, Zürcher T, Nieto A, Ortín J (1999) Replication of Orthomyxoviruses. *Adv Virus Res* **54**: 319-348
204. Pritlove DC, Poon LLM, Devenish LJ, Mike B, Leahy MB, Brownlee GG (1999) A hairpin loop at the 5' end of influenza A virus virion RNA is required for synthesis of poly(A)+ mRNA in vitro. *J Virol* **73**: 2109-2114
205. Qin W, Luo H, Nomura T, Hayashi N, Yamashita T, Murakami S (2002) Oligomeric interaction of hepatitis C virus NS5B is critical for catalytic activity of RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* **277**(3): 2132-2137
206. Radon J (1917) Ueber die Bestimmung von Funktionen durch ihre Integralwerte laengs gewisser Mannigfaltigkeiten. Berichte ueber die Verhandlungen der Koeniglich Saechsischen Gesellschaft der Wissenschaften zu Leipzig. *Math Phys Klasse* **69**: 262-277
207. Rao P, Yuan W, Krug RM (2003) Crucial role of CA cleavage sites in the cap-snatching mechanism for initiating viral mRNA synthesis. *Embo J* **22**(5): 1188-1198
208. Resa-Infante P, Jorba N, Zamarreno N, Fernandez Y, Juarez S, Ortín J (2008) The host-dependent interaction of alpha-importins with influenza PB2 polymerase subunit is required for virus RNA replication. *PLoS One* **3**(12): e3904
209. Rivera-Calzada A (2008) Biología estructural de la reparación de roturas de doble cadena en el ADN. *Tesis Doctoral*
210. Roberts PC, Lamb RA, Compans RW (1998) The M1 and M2 proteins of influenza A virus are important determinants in filamentous particle formation. *Virology* **240**(1): 127-137
211. Robertson JS (1979) 5' and 3' terminal nucleotide sequences of the RNA genome segments of influenza virus. *Nucleic Acids Res* **6**(12): 3745-3757
212. Rott R, Scholtissek C (1970) Specific inhibition of influenza replication by alpha-amanitin. *Nature* **228**(5266): 56
213. Sanz-Ezquerro JJ, de la Luna S, Ortín J, Nieto A (1995) Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of co-expressed proteins. *J Virol* **69**: 2420-2426
214. Scheiffele P, Rietveld A, Wilk T, Simons K (1999) Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *J Biol Chem* **274**(4): 2038-2044
215. Scheres SH, Gao H, Valle M, Herman GT, Eggermont PP, Frank J, Carazo JM (2007) Disentangling conformational states of macromolecules in 3D-EM through likelihood optimization. *Nat Methods* **4**(1): 27-29
216. Scheres SH, Valle M, Nunez R, Sorzano CO, Marabini R, Herman GT, Carazo JM (2005) Maximum-likelihood multi-reference refinement for electron microscopy images. *J Mol Biol* **348**(1): 139-149
217. Schroeder C, Heider H, Moncke-Buchner E, Lin TI (2005) The influenza virus ion channel and maturation cofactor M2 is a cholesterol-binding protein. *Eur Biophys J* **34**(1): 52-66
218. Sha B, Luo M (1997) Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. *Nat Struct Biol* **4**(3): 239-244
219. Shapira SD, Gat-Viks I, Shum BO, Dricot A, de Grace MM, Wu L, Gupta PB, Hao T, Silver SJ, Root DE, Hill DE, Regev A, Hacohen N (2009) A physical and regulatory map of host-influenza interactions reveals pathways in H1N1 infection. *Cell* **139**(7): 1255-1267
220. Shapiro GI, Gurney TJ, Krug RM (1987) Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. *J Virol* **61**(3): 764-773
221. Shih SR, Nemeroff ME, Krug RM (1995) The choice of alternative 5' splice sites in influenza virus M1 mRNA is regulated by the viral polymerase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(14): 6324-6328
222. Simpson-Holley M, Ellis D, Fisher D, Elton D, McCauley J, Digard P (2002) A functional link between the actin

cytoskeleton and lipid rafts during budding of filamentous influenza virions. *Virology* **301**(2): 212-225

223. Skehel JJ, Bizebard T, Bullough PA, Hughson FM, Knossow M, Steinhauer DA, Wharton SA, Wiley DC (1995) Membrane fusion by influenza hemagglutinin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **60**: 573-580

224. Smith GL, Hay AJ (1982) Replication of the influenza virus genome. *Virology* **118**: 96-108

225. Smith W, Andrewes CH, Laidlaw PP (1933) A virus obtained from influenza patients. *The Lancet* **222**(5732): 66-68

226. Sorzano CO, Marabini R, Velazquez-Muriel J, Bilbao-Castro JR, Scheres SH, Carazo JM, Pascual-Montano A (2004) XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy. *J Struct Biol* **148**(2): 194-204

227. Stegmann T, Booy FP, Wilschut J (1987a) Effects of low pH on influenza virus. Activation and inactivation of the membrane fusion capacity of the hemagglutinin. *J Biol Chem* **262**(36): 17744-17749

228. Stegmann T, Morselt HW, Scholma J, Wilschut J (1987b) Fusion of influenza virus in an intracellular acidic compartment measured by fluorescence dequenching. *Biochim Biophys Acta* **904**(1): 165-170

229. Stewart M (2007) Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(3): 195-208

230. Stuart-Harris CH, Schild GC, Oxford JS (1985) *Influenza. The viruses and the disease*, Second edition edn. Victoria: Arnold Press.

231. Subbarao EK, London W, Murphy BR (1993) A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J Virol* **67**(4): 1761-1764

232. Sugiyama K, Obayashi E, Kawaguchi A, Suzuki Y, Tame JR, Nagata K, Park SY (2009) Structural insight into the essential PB1-PB2 subunit contact of the influenza virus RNA polymerase. *Embo J* **28**(12): 1803-1811

233. Tarendeau F, Boudet J, Guilligay D, Mas PJ, Bougault CM, Boulo S, Baudin F, Ruigrok RW, Daigle N, Ellenberg J, Cusack S, Simorre JP, Hart DJ (2007) Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nat Struct Mol Biol* **14**(3): 229-233

234. Tarendeau F, Crepin T, Guilligay D, Ruigrok RW, Cusack S, Hart DJ (2008) Host determinant residue lysine 627 lies on the surface of a discrete, folded domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *PLoS Pathog* **4**(8): e1000136

235. Tiley LS, Hagen M, Mathews JT, Krystal M (1994) Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequences located at the 5'-end of the viral RNAs. *J Virol* **68**: 5108-5116

236. Tomoo K, Shen X, Okabe K, Nozoe Y, Fukuhara S, Morino S, Sasaki M, Taniguchi T, Miyagawa H, Kitamura K, Miura K,

Ishida T (2003) Structural features of human initiation factor 4E, studied by X-ray crystal analyses and molecular dynamics simulations. *J Mol Biol* **328**(2): 365-383

237. Torreira E, Schoehn G, Fernandez Y, Jorba N, Ruigrok RW, Cusack S, Ortin J, Llorca O (2007) Three-dimensional model for the isolated recombinant influenza virus polymerase heterotrimer. *Nucleic Acids Res* **35**(11): 3774-3783

238. Ulmanen I, Broni BA, Krug RM (1981) The role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m7GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 7355-7359

239. van Heel M (1984) Multivariate statistical classification of noisy images (randomly oriented biological macromolecules). *Ultramicroscopy* **13**: 165-183

240. Varghese JN, Laver WG, Colman PM (1983) Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature* **303**(5912): 35-40

241. Vreede FT, Brownlee GG (2007) Influenza virion-derived viral ribonucleoproteins synthesize both mRNA and cRNA in vitro. *J Virol* **81**(5): 2196-2204

242. Vreede FT, Jung TE, Brownlee GG (2004) Model suggesting that replication of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates. *J Virol* **78**(17): 9568-9572

243. Wang P, Palese P, O'Neill RE (1997) The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal. *J Virol* **71**(3): 1850-1856

244. Wang QM, Hockman MA, Staschke K, Johnson RB, Case KA, Lu J, Parsons S, Zhang F, Rathnachalam R, Kirkegaard K, Colacino JM (2002) Oligomerization and cooperative RNA synthesis activity of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* **76**(8): 3865-3872

245. Watanabe T, Watanabe S, Noda T, Fujii Y, Kawaoka Y (2003) Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes. *J Virol* **77**(19): 10575-10583

246. Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC (1988) Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* **333**(6172): 426-431

247. White HE, Saibil HR, Ignatiou A, Orlova EV (2004) Recognition and separation of single particles with size variation by statistical analysis of their images. *J Mol Biol* **336**(2): 453-460

248. Wigler M, Pellicer A, Silverstein S, Axel R, Urlaub G, Chasin L (1979) DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(3): 1373-1376

249. Williams RC, Fisher HW (1970) Electron microscopy of tobacco mosaic virus under conditions of minimal beam

exposure. *J Mol Biol* **52**(1): 121-123

250. Wise HM, Foeglein A, Sun J, Dalton RM, Patel S, Howard W, Anderson EC, Barclay WS, Digard P (2009) A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol* **83**(16): 8021-8031

251. Worch R, Niedzwiecka A, Stepinski J, Mazza C, Jankowska-Anyszka M, Darzynkiewicz E, Cusack S, Stolarski R (2005) Specificity of recognition of mRNA 5' cap by human nuclear cap-binding complex. *RNA* **11**(9): 1355-1363

252. Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, Le MQ, Nidom CA, Sakai-Tagawa Y, Muramoto Y, Ito M, Kiso M, Horimoto T, Shinya K, Sawada T, Usui T, Murata T, Lin Y, Hay A, Haire LF, Stevens DJ, Russell RJ, Gamblin SJ, Skehel JJ, Kawaoka Y (2006) Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* **444**(7117): 378-382

253. Yamanaka K, Ishihama A, Nagata K (1990) Reconstitution of influenza virus RNA-nucleoprotein complexes structurally resembling native viral ribonucleoprotein cores. *J Biol Chem* **265**(19): 11151-11155

254. Yasuda J, Nakada S, Kato A, Toyoda T, Ishihama A (1993) Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology* **196**(1): 249-255

255. Ye Q, Krug RM, Tao YJ (2006) The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature* **444**(7122): 1078-1082

256. Ye Z, Baylor NW, Wagner RR (1989) Transcription-inhibition and RNA-binding domains of influenza A virus matrix protein mapped with anti-idiotypic antibodies and synthetic peptides. *J Virol* **63**: 3586-3594

257. Ye Z, Pal R, Fox JW, Wagner RR (1987) Functional and antigenic domains of the matrix (M1) protein of influenza A virus. *J Virol* **61**: 239-246

258. Young RJ, Content J (1971) 5' -terminus of influenza virus RNA. *Nature New Biol* **230**: 140-142

259. Yuan P, Bartlam M, Lou Z, Chen S, Zhou J, He X, Lv Z, Ge R, Li X, Deng T, Fodor E, Rao Z, Liu Y (2009) Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site. *Nature* **458**(7240): 909-913

260. Zebedee SL, Lamb RA (1988) Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J Virol* **62**(8): 2762-2772

261. Zhang X, Settembre E, Xu C, Dormitzer PR, Bellamy R, Harrison SC, Grigorieff N (2008) Near-atomic resolution using electron cryomicroscopy and single-particle reconstruction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(6): 1867-1872

262. Zheng H, Palese P, Garcia Sastre A (1996) Nonconserved nucleotides at the 3' and 5' ends of an influenza A virus RNA play an important role in viral RNA replication. *Virology* **217**(1): 242-251

263. Zhou ZH (2008) Towards atomic resolution structural determination by single-particle cryo-electron microscopy. *Curr Opin Struct Biol* **18**(2): 218-228



ANEXOS

1. Abreviaturas
2. Tabla de oligonucleótidos
3. Publicaciones

1. Abreviaturas

7mGTP-S	Resina 7mGTP-Sepharose 4B
aa	Aminoácido
BiFC	Biomolecular Fluorescence Complementation
BL-D	Azul dextrano (Blue dextran)
BSA	Seroalbúmina bobina (Bobine serum albumin)
CAT	Cloranfenicol acetil transferasa
crio-ME	Criomicroscopía electrónica
C	Catalasa
C-terminal	carboxi-terminal
DDB-1	DNA-damage binding protein 1
Ebp-1	Erb-B3 binding protein 1
F	Ferritina
HA	Hemaglutinina
HCV	Virus de la Hepatitis C
hpi	Horas pos-infección
HSP	heat shock proteins
IF	Inmunofluorescencia
M1	Proteína de membrana 1
M2	Proteína de membrana 2
ME	Microscopía electrónica
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero (messenger Ribonucleic acid)
NA	Neuraminidasa
NEP	Proteína de Exportación Nuclear
Ni²⁺-NTA	Ni ²⁺ -NTA-Agarosa
NLS	Señal de localización celular
NP	Nucleoproteína
NS1	Proteína no estructural 1
nt	nucleótido
N-terminal	amino-terminal
ORF	Fase de lectura abierta (Open Reading Frame)
PA	Proteína Ácida
PARP1	poly-adenyl-ribosyl-polymerase 1
PB1	Proteína Básica 1
PB2	Proteína Básica 2
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid)
RNP	Ribonucleoproteína
RpRd	RNA polimerasa RNA dependiente
SPR	Surface Plasmon Resonance
T	Tiroglobulina
UTR	Región no traducida (Untranslated region)
WB	Western Blot

2. Tabla de oligonucleótidos

09_5vRNA(A)	5' TATTAGTAGAAACAAGGAAAAAGAAAGA- AAAGAAAAACCTGCTTTTGC 3'
10_3vRNA(T)	5' GGGAGCAAAAGCAGGG- TTTTTCTTTTCTTTCTTTTCCCTGTTTCTACT 3'
11_5cRNA(A)	5' TATTAGCAAAAGCAGGAAAAAGAAAGA- AAAGAAAAACCTGTTTCTAC 3'
12_3cRNA(T)	5' GGGAGTAGAAACAAGG- TTTTTCTTTTCTTTCTTTTCCCTGCTTTTGCT 3'
15_5HisT-Ec-PA	5' CGAAACCATGTCGTACTACCATCACCATCACCATCAGATTAC- GATATCCCAACGACCGAAAAACCTGTATTTTCAGGGCGG 3'
16_3His-Ec-PA	5' AATTCCGCCCTGAAAAATACAGGTTTTTCGGTCGTTGGGATATCGTA- ATCGTGATGGTGATGGTGATGGTAGTACGACATGGTTTCGGTAC 3'
24_sv40-wt	5' AATTCGGATGGCCATCAATCCAAAAAA- GAAAAGGAAGGTTTAAT 3'
25_sv40-wt-c	5' CTAGATTAAACCTTCCTTTTCTTTTGGATTGATGGCCATCCG 3'
26_sv40-mut	5' AATTCAGATGGCCATCAATCCAAAAAA- GAAAAGGAAGGTTTAAT 3'
27_sv40-mut-c	5' CTAGATTAAACCTTCCTTTTCTTTTGGATTGATGGCCATCTG 3'
30_E361Af	5' GTGCATGAAGGTTACGCGGAGTTCACAATGGTG 3'
31_E361Ar	5' CACCATTGTGAACTCCGCGTACCCTTCATGCAC 3'
32_F323Af	5' ACTGAGAATCAGCTCATCCGCCAGTTTTGGTGGGTTTACA 3'
33_F323Ar	5' TGTGAACCCACCAAACTGGCGGATGAGCTGATTCTCAGT 3'
34_F325Af	5' ACTGAGAATCAGCTCATCCTTCAGTGTGGTGGGTTTACA 3'
35_F325Ar	5' TGTGAACCCACCAGCACTGAAGGATGAGCTGATTCTCAGT 3'
37_VQr	5' AAGTTGATGCATGGGATTCAACCGCCCGC- CACCGAAATTCAGGTCACCTC 3'
39_VQf	5' GAGGTGACCTGAATTTTCGGTGGCGGGCGG- TTGAATCCCATGCATCAACTT 3'
41_F404Af	5' GCGATAATTGTAGCCATGGTGGCTTCACAAGAGGATTGCATGAT 3'
42_F404Ar	5' ATCATGCAATCCTCTTGTGAAGCCACCATGGCTACAATTATCGC 3'
43_H357Af	5' CAAACATTGAAAATAAGGGTGGCTGAAGGGTACGAGGAGTTCAC 3'
44_H357Ar	5' GTGAACTCCTCGTACCCTTCAGCCACCCTTATTTTCAATGTTTG 3'
46_H357Wr	5' CATGTGAACTCCTCGTACCCTTCCCA- CACCTTATTTTCAATGTTTGGAG 3'
48_K376Ar	5' TCTCCTGGTTGCTGCTCTGAGTATAGCTGTTGCCCTTTTC 3'
49_H357Wf2	5' CTCCAAACATTGAAAATAAGGGTGTGGGA- AGGGTACGAGGAGTTCACAATG 3'

50_K376Af2	5' GAAAAGGGCAACAGCTATACTCAGAGCAGCAACCAGGAGA 3'
51_NLSPB2	5' GCAAGGAGACGTGGTGGTGGTAATGATGGCCATCAATTAAT 3'
52_NLSPB2-c	5' CTAGATTAATTGATGGCCATCATTACCAACACCACGTCTCC 3'
53_NLSPB2.SV40	5' GCAAGGAGACGTGGTGGTGGTAATGATGGCCAT- CAATCCAAAAAAGAAAAGGAAGTTTAAT 3'
54_NLSPB2.SV40-c	5' CTAGATTAAACCTTCCTTTCTTTTTTGGATT- GATGGCCATCATTACCAACACCACGTCTCC 3'
56_B2BspEI	5' GCTGGCACTTTAATTGAAGACCC 3'
57_B2hisApa	5' TGACACTATAGAATAGGGCCCAACTCA- ATGATGATGATGATGATGG 3'
81_D445Ef	5' GATGGACTCCAATCTTCTGAGGATTTTGCTCTCATAGTGAA 3'
82_D445Er	5' TTCACTATGAGAGCAAAATCCTCAGAAGATTGGAGTCCATC 3'
87_oligoE	5' CTTTTTCCTTGTTTCTACT 3'
88_oligoF	5' GAAAAACCTTGCTTTTGCT 3'
89_oligoG	5' CTTTTCCCTGCTTTTGCT 3'
90_oligoH	5' GAAAAACCTTGTTTCTACT 3'
91_R737Qf	5' TGTTGGTAATGAAACAAAAACGGGACTCTA 3'
92_R737Qr	5' TAGAGTCCCGTTTTGTTCATTACCAACA 3'
93_K738Qf	5' TGGAATGAAACGACAACGGGACTCTAGC 3'
94_K738Qr	5' GCTAGAGTCCCGTTGTCGTTTCATTACCA 3'
95_K752NQf	5' AGACAGCGACCAATAGAATTCAGATGGCCATCA 3'
96_K752NQr	5' TGATGGCCATCTGAATCTATTGGTCGCGTTCT 3'

